

Jmjd6 katalysiert Lysin-5-Hydroxylierungen an U2AF-65 und ist ein potentieller Regulator des Spleißprozesses



Alexander Wolf

Dissertation der Fakultät für Biologie

Ludwig-Maximilians-Universität

München 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Jmjd6 katalysiert Lysin-5-Hydroxylierungen an U2AF-65 und ist ein potentieller Regulator des Spleißprozesses“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Martinsried, 06.05.2009

Alexander Wolf

Promotionsgesuch eingereicht am 19.05.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2009

1. Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen	03
Abkürzungen	04
Zusammenfassung	06
1. Einleitung	07
1.1 Entdeckung von Jmjd6 als Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR)	08
1.2 Entwicklungsdefekte in Jmjd6 ^{-/-} Vertebratenembryonen	08
1.3 Jmjd6-"knock-out" Experimente in Invertebraten	11
1.4 Domänenstruktur des Jmjd6-Proteins	12
1.4.1 JmjC Domäne	13
1.4.2 Sumoylierung	15
1.4.3 "AT-hook"	16
1.5 Eisen(II) & 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen	17
1.5.1 DNA-Reperatur - AlkB	18
1.5.2 Hypoxieantwort - FIH	18
1.5.3 Histon Demethylasen	20
1.6 Zielsetzung	23
2. Ergebnisse	24
2.1 Jmjd6-Expressionsmuster im Kern	24
2.1.1 Jmjd6 Expression im Interchromatinraum	24
2.1.2 Kolokalisation von Jmjd6 mit SC35 Domänen	26
2.1.3 Jmjd6 Verteilung im Kern ist RNA abhängig	27
2.1.4 Lokalisation von Jmjd6-GFP	30
2.2 Identifikation von Jmjd6 Interaktionspartnern	31
2.2.1 Jmjd6 "Tandem Affinity Purification"	31
2.2.2 "Multidimensional Protein Identification Technology" (MudPIT)	34
2.2.3 Jmjd6-Interaktionstests nach Immunpräzipitation	38
2.3 Jmjd6-Oligomerisierung und Interaktion mit U2AF65	41
2.3.1 Oligomerisierung des endogenen Jmjd6	41
2.3.2 Expression von Jmjd6-Mutanten als GFP-Fusionsproteine	42
2.3.3 Jmjd6-Interaktionstests im F2H-Assay	46
2.3.4 Charakterisierung der U2AF65-Bindestelle im Jmjd6	50
2.4 Jmjd6 hat Lysin-5-Hydroxylaseaktivität	51
2.4.1 Lysin-Hydroxylierung an Peptiden und rekombinantem U2AF65	52
2.4.2 Endogenes U2AF65 wird von Jmjd6 an Lysin hydroxyliert	52
2.4.3 Jmjd6 Auto-Hydroxylierung	56
2.5 Jmjd6 - Einfluss auf Spleißen	57
2.5.1 "Double-Reporter-Splicing-Assay"	57
2.5.2 Einfluss von Jmjd6 auf U2AF65- und SC35-Kernverteilung	60
2.6 Jmjd6 im Nukleolus	62
2.6.1 Δ338-403 Jmjd6 akkumuliert im "Fibrillar Centre" des Nukleolus	62
2.5.1 Wildtyp Jmjd6 im Nukleolus	67
3. Diskussion	74
3.1 Jmjd6 ist eine Lysin-5-Hydroxylase	75
3.1.1 Posttranslationale Modifikationen an Lysin	75
3.1.2 "U2 small nuclear ribonucleoprotein auxillary factor" (U2AF65)	76
3.1.3 Auto-Hydroxylierung des Jmjd6	80
3.1.4 Jmjd6 hat Histon-Arginin Demethylase Aktivität?	81
3.2 Jmjd6 beeinflusst den Spleißprozess	82
3.2.1 "Double-Reporter-Splicing-Assay"	83
3.2.2 Weitere Jmjd6 Interaktionspartner	84
3.2.3 Jmjd6 und SC35	85

3.3	Jmjd6 Interaktionsstudien	86
3.3.1	Jmjd6 bildet Homodimere und -oligomere	86
3.3.2	Interaktion mit U2AF65	86
3.4	Jmjd6 im Nukleolus	87
4.	Ausblick	89
5.	Material	91
5.1	Chemikalien	91
5.2	Marker	92
5.3	Enzyme	93
5.4	Transfektionsreagenzien	93
5.5	Kits	93
5.6	Mikroskope	93
5.7	Zellen	93
5.8	Antikörper	94
5.9	Primer	95
5.10	Plasmide	97
5.11	Klone	97
6.	Methoden	99
6.1	"Western Blot"	99
6.2	Coomassiefärbung	99
6.3	Zellkultur	100
6.4	Immunfluoreszenz.....	100
6.5	Transfektion	101
6.6	Zellaufschluss	101
6.7	mRNA-Isolierung aus HeLa-Zellen und cDNA-Synthese.....	102
6.8	RNAi	102
6.9	"Tandem-Affinity-Purification" (TAP-tag).....	103
6.10	"Multidimensional Protein Identification Technology" (MudPIT).....	105
6.11	GFP "Pull-down"	105
6.12	"Fluorescent two hybrid assay" (F2H)	106
6.13	Immunpräzipitation mit anti-U2AF65 Antikörper (U4758).....	106
6.14	Immunpräzipitation mit anti-Jmjd6 Antikörper (ab10526).....	106
6.15	In-Gel-Verdau von U2AF65	107
6.16	LC-MS/MS	108
6.17	"Double-Reporter-Splicing-Assay"	108
7.	Literaturverzeichnis	110
	Publikationsliste/Patente	120
	Lebenslauf	121
	Danksagung	122

Abbildungen

- Abb. 01 | Jmjd6-"knock-out" Mäuse
- Abb. 02 | Jmjd6-Sequenzalignment
- Abb. 03 | Konservierte Aminosäurereste zwischen FIH-1 und Hydra Jmjd6
- Abb. 04 | Fe(II)-2-OG abhängige Dioxygenasen
- Abb. 05 | Reaktionsschemata verschiedener 2-OG-Dioxygenasen
- Abb. 06 | Proteine mit einer JmjC-Domäne
- Abb. 07 | Übersicht der Histon-Demethylasen
- Abb. 08 | Endogenes Jmjd6 in HeLa-Zellen
- Abb. 09 | Anti-Jmjd6 Antikörper im "Western Blot"
- Abb. 10 | Jmjd6 Kolokalisation mit SC35-Domänen in HeLa-Zellen
- Abb. 11 | Jmjd6 und SC35 während der Mitose
- Abb. 12 | Jmjd6 nach RNase A Behandlung
- Abb. 13 | Überexpression von Jmjd6-GFP bzw. Jmjd6-cherry Fusionsproteinen
- Abb. 14 | Aufbau des "TAP-tag" Fusionsprotein
- Abb. 15 | Expression des Jmjd6-"TAP-tag" Fusionsproteins in HEK 293T Zellen
- Abb. 16 | Coomassiefärbung und "Western Blot" nach Jmjd6-"TAP-tag" Reinigung
- Abb. 17 | Potentielle Jmjd6-Interaktionspartner nach "TAP-tag" Versuch
- Abb. 18 | Schematische Darstellung eines Introns und des Prä-Spleißosoms
- Abb. 19 | Ergebnis des "TAP-tag-Screens" für ausgewählte Proteine
- Abb. 20 | GFP-Pulldown von Jmjd6-GFP bzw. U2AF65-GFP
- Abb. 21 | Immunpräzipitation von endogenem U2AF65
- Abb. 22 | Interaktion von U2AF65 mit überexprimiertem und endogenem Jmjd6
- Abb. 23 | Immunpräzipitation des endogenen Jmjd6
- Abb. 24 | Schematische Darstellung aller Jmjd6-Mutanten
- Abb. 25 | N-terminale Jmjd6-Deletionsmutanten in HeLa-Zellen
- Abb. 26 | C-terminale Jmjd6-Deletionsmutanten in HeLa-Zellen
- Abb. 27 | "Active-site" Jmjd6-Mutanten (ASM1 & ASM2) in HeLa-Zellen
- Abb. 28 | ATHM-Jmjd6-Mutante in HeLa-Zellen
- Abb. 29 | Jmjd6 im "Fluorescent-two-hybrid-Assay"
- Abb. 30 | F2H-Assay mit N-terminalen Jmjd6-Deletionsmutanten
- Abb. 31 | F2H-Assay mit "Active-site"-Jmjd6 Mutanten und "AT-hook"-Mutante
- Abb. 32 | F2H-Assay mit C-terminalen Jmjd6-Deletionsmutanten
- Abb. 33 | Interaktion Jmjd6 und U2AF65
- Abb. 34 | Lysin Hydroxylierung durch Jmjd6 in vitro
- Abb. 35 | Lysin276 Hydroxylierung im endogenen U2AF65
- Abb. 36 | Lysin15 Hydroxylierung im endogenen U2AF65
- Abb. 37 | Vergleich der K15 Hydroxylierung in endogenem U2AF65 nach Jmjd6 und "mock" Transfektion
- Abb. 38 | Lysin167 Hydroxylierung in endogenem Jmjd6
- Abb. 39 | "Double-reporter-splicing-assay"
- Abb. 40 | "Double-reporter-splicing-assay" nach Jmjd6-Überexpression - Teil 1
- Abb. 41 | "Double-reporter-splicing-assay" nach Jmjd6-Überexpression - Teil 2
- Abb. 42 | "Double-reporter-splicing-assay" nach Jmjd6-knock-down
- Abb. 43 | Antikörper-Doppelfärbung von Jmjd6 und U2AF65
- Abb. 44 | U2AF65-Expression in Jmjd6-GFP- und GFP-exprimierenden HeLa-Zellen
- Abb. 45 | SC35-Expression in Jmjd6-GFP-, ASM2-GFP und GFP-exprimierenden HeLa-Zellen
- Abb. 46 | Antikörperdoppelfärbung von Jmjd6 und SC35 in Jmjd6-"knock-down" HeLa-Zellen
- Abb. 47 | Δ 338-403 Jmjd6 akkumuliert im Nukleolus
- Abb. 48 | Der Nukleolus ist in drei Kompartimente unterteilt
- Abb. 49 | Δ 338-403-Jmjd6 Mutante akkumuliert im "Fibrillar Centre" des Nukleolus
- Abb. 50 | Jmjd6 im Nukleolus - Teil 1
- Abb. 51 | Jmjd6 im Nukleolus - Teil 2
- Abb. 52 | Liste aller potentiellen Jmjd6-Interaktionspartner nach "TAP-tag" Versuch

- Abb. 53** | "JmJC-domain-only" Proteine
Abb. 54 | Schematische Darstellung der U2AF65-Domänenstruktur
Abb. 55 | Peptidsequenz und Domänenstruktur des humanen U2AF65
Abb. 56 | Struktur der RNA-Bindedomänen (RRM1 & RRM2) des humanen U2AF65
Abb. 57 | Sequenzalignment von U2AF65-Proteinen aus verschiedenen Spezies
Abb. 58 | Jmjd6-Sequenzalignment

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
A (Ala)	Alanin
ACN	Acetonitril
AHC	Ammoniumhydrogencarbonat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BHK	baby hamster kidney
BSA	Bovines Serumalbumine
C (Cys)	Cystein
C10	Proteinase-Inhibitor Cocktail aus Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A
CFP	Cyano Fluorescent Protein
Cy3	Cyanin
D	Asparaginsäure
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
G (Gly)	Glycin
GFP	Green Fluorescent Protein
Glu	Glutaminsäure

Abkürzung	Erklärung
h	Stunde
H	Histidin
HEK	human embryonic kidney
His	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K	Lysin
L (Leu)	Leucin
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
Lys	Lysin
M (Met)	Methionin
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
N	Asparagin
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P40
P (Pro)	Prolin
PB	Pefabloc
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
ppm	parts-per-million
R	Arginin
S (Ser)	Serin
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SCX	SDB Copolymer modifiziert mit Sulfonsäure (starker Kationenaustauscher)
SDB	Poly-Styrene-Divinylbenzen
SDS	Natriumdodecylsulfat
T (Thr)	Threonin
TFA	Trifluor-Essigsäure
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
V	Volt
V (Val)	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Jmjd6 als Eisen(II)-2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase detailliert charakterisiert. Mit Hilfe eines "Tandem-Affinity-Purification"-Experiments ("TAP-tag") konnten zuerst potentielle Substrate von Jmjd6 identifiziert werden. Ein Großteil der identifizierten Proteine spielt eine Rolle beim pre-mRNA Spleißen. Interaktionen mit Proteinen der "splice-site"-Erkennung, wie U2AF65, hLuc7A, hLuc7B1, hLuc7B2 wurden in Immunpräzipitationen bestätigt. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der Kernlokalisation von Jmjd6 im Interchromatinraum und der RNase-Sensitivität des Jmjd6 Proteins.

Jmjd6 kann U2AF65 an spezifischen Lysinresten hydroxylieren. Dies konnte sowohl in-vitro, an Peptiden und rekombinantem Protein, als auch in-vivo an endogenem U2AF65 per LC-MS/MS-Analyse eindeutig belegt werden. Auch eine Auto-Hydroxylierung am Lysin167 des Jmjd6-Proteins wurde beobachtet. Hydroxy-5-Lysin ist eine bisher unbekannte posttranslationale Modifikation an intrazellulären Proteinen. Ein möglicher Einfluss dieser Modifikation auf den Spleißprozess konnte mit Hilfe des "Double-Reporter-Splicing-Assays" nachgewiesen werden. Die Überexpression von Jmjd6 hemmt hierbei das Spleißen des Reporterkonstrukts, wohingegen der Jmjd6-"knock-down" einen gegenteiligen Effekt hat.

Jmjd6 bildet stabile Homodimere und -oligomere. Die dafür essentiellen Proteinbereiche konnten durch Mutationsstudien auf die Aminosäuren 25-48 festgelegt werden. Auch scheint die Homooligomerisierung essentiell für die Interaktion mit U2AF65 und die einhergehende enzymatische Aktivität. Für die Bindung an U2AF65 konnten die Aminosäuren 4-7 als essentiell identifiziert werden.

Viele JmjC-Proteine wurden in den letzten Jahren als Histon-Demethylasen identifiziert. Mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit wurde erstmals eine Verbindung von JmjC-Proteinen zum pre-mRNA Spleißprozess aufgezeigt. Die Lysin-5-Hydroxylierung von Spleißfaktoren könnte einen neuen Mechanismus der Spleißregulation darstellen.

1. EINLEITUNG

Posttranslationale Modifikationen leisten einen entscheidenden Beitrag zur Proteindiversität. Sie können strukturelle Bedeutungen haben oder regulatorische Funktionen übernehmen. Die fünf häufigsten kovalenten posttranslationalen Modifikationen sind Phosphorylierung, Acylierung, Alkylierung, Glykosilierung und Oxidation und werden jeweils von spezifischen Enzymen katalysiert. Die Enzymgruppe der Protein Hydroxylasen katalysiert die Oxidation von Aminosäureresten und garantiert dadurch z.B. die fehlerfreie Bildung von Kollagenfasern oder reguliert die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel (Hypoxie). Ähnliche Enzyme sind auch in der Lage oxidativ zu demethylieren (Walsh CT et al, 2005). In jüngster Zeit konnten Proteine mit Jumonji (JmjC) Domäne als Histon-Lysin-Demethylasen identifiziert werden. Sie gehören zur Enzymgruppe der Eisen(II) und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Fe(II)-2-OG-Dioxygenasen), mit einem charakteristischen aktiven Zentrum, welches Fe(II) komplexiert (Klose RJ et al, 2006a). Ein weiteres bekanntes JmjC-Domänen Protein ist der "Factor-inhibiting-HIF" (FIH). FIH besitzt ebenfalls eine Oxigenaseaktivität, hydroxyliert aber einen spezifischen Asparaginrest im Transkriptionsfaktor "Hypoxia-inducible-factor" (HIF) α , der in der Hypoxieantwort der Zelle eine entscheidende Rolle spielt.

Jmjd6, auch ein Protein mit JmjC-Domäne, ist Inhalt dieser Doktorarbeit. Jmjd6 war ursprünglich als Rezeptor für Phosphatidylserin (PSR) auf apoptotischen Zellen identifiziert worden (Fadok et al, 2000). Bald war jedoch klar, dass Jmjd6 kein Membranrezeptor sein konnte. Jmjd6-GFP-Fusionsproteine in diversen humanen und murinen Zelllinien zeigten ausschließlich Kernlokalisation (Cui et al, 2004). Homozygote Jmjd6^{-/-} "knock-out" Mausembryonen zeigten dramatische Entwicklungsschäden und starben perinatal (Li et al, 2003; Kunisaki et al, 2004; Böse et al, 2004). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der enzymatischen Aktivität und zellulären Funktion von Jmjd6. In dieser Einleitung werden zuerst die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen am Jmjd6-Protein dargestellt, deren Interpretationen teilweise noch von der Annahme geprägt waren, dass Jmjd6 der Phosphatidylserin Rezeptor sei.

1.1 ENTDECKUNG VON JMJD6 ALS PHOSPHATIDYLSERIN-REZEPTOR (PSR)

Die Gruppe um Valerie Fadok generierte einen monoklonalen Antikörper (mAb217) gegen mit "transforming growth factor" β (TGF- β) und β -Glucan stimulierte Makrophagen. Eine Inkubation der stimulierten Makrophagen mit Phosphatidylserin-Liposomen (PS) inhibierte die Makrophagen-Antikörperbindung. Auch war es durch Inkubation des Antikörpers mit Makrophagen möglich, die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch diese Makrophagen deutlich zu verringern. Mit FACS-Analysen wurde das Antigen von mAb217 an der Zelloberfläche von verschiedenen humanen und murinen Makrophagenzelllinien, sowie Fibroblasten- und Epithelzelllinien (z.B. HeLa, HEK 293, NIH3T3) detektiert. An humanen Blutzellen, wie etwa Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile und Erythrozyten konnte der Antikörper nicht binden (Fadok et al, 2000). Mit Hilfe von "Phagen-Display" und "biopanning" wurde ein bislang unbekanntes Protein als Antigen von mAb217 identifiziert. Fadok et al deklarierten das unbekannte Protein als den lang gesuchten Rezeptor zur Erkennung von PS auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen und nannten es Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR). In anderen Species, wie Maus, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Hydra vulgaris* fanden sich stark konservierte Homologe mit bis dato ebenfalls unbekannter Funktion.

Jmjd6-"knock-out" bzw. -"knock-down" Experimente in verschiedenen Organismen konnten zeigen, dass Jmjd6 bei der Morphogenese im Embryo, zumindest in Vertebraten, unabdingbar ist. Versuche, die Ursache der dramatischen Entwicklungsschäden in den Jmjd6^{-/-} Embryonen zu erklären, führten bei den verschiedenen Arbeitsgruppen zu konträren Ergebnissen. Dadurch kamen erste Zweifel an der Phagozytose-Rezeptor-Theorie für Jmjd6 auf.

1.2 ENTWICKLUNGSDEFEKTE IN JMJD6^{-/-} VERTEBRATENEMBRYONEN

Drei unabhängig generierte Jmjd6- "knock-out" Mauslinien zeigten bei Jmjd6^{-/-} Mäusen drastische Entwicklungsdefekte in verschiedenen Organen während der Embryogenese (siehe Abb. 01). In allen drei Fällen führten diese zum Tod des Embryos vor bzw. wenige Stunden nach der Geburt (Li et al, 2003; Kunisaki et al, 2004; Böse et al, 2004). Die beobachteten Defekte in den Jmjd6^{-/-}

Embryonen waren in den drei Experimenten uneinheitlich, was auf die verschiedenen genetischen Hintergründe der Mäuse zurückgeführt wurde. Erste sichtbare Anomalien traten etwa ab E12,5 auf. Im Folgenden waren unter anderem Missbildungen des Gehirns bis zur Exencephalie (Böse et al, 2004; Li et al, 2003) zu beobachten. Die Entwicklung der Herzmuskulatur, der Nieren, des Thymus und der Leber waren stark beeinträchtigt (Böse et al, 2004; Schneider et al 2004; Kunisaki et al, 2004). Die Zahl der fötalen Leberzellen war zum Zeitpunkt E13,5 in den "knock-out" Embryonen auf weniger als 20% des Wildtypniveaus geschrumpft (Kunisaki et al, 2004). Die Augenentwicklung war betroffen, so dass etwa 15% der Tiere nur ein Auge oder gar keine Augen hatten (Böse et al, 2004). Eine Hemmung der Erythrozytenreifung in einem sehr frühen Erythroblastenstadium war ebenso zu beobachten (Böse et al, 2004; Kunisaki et al, 2004), wie eine unfertige Ausbildung der Lungenflügel zum Zeitpunkt der Geburt (Li et al, 2003). Böse et al konnten am Tag E16,5 beobachten, dass im Vergleich zum Wildtyp kaum Alveolen und Bronchiolen ausgebildet waren. Dagegen hatten die *Jmjd6*^{-/-} Mäuse zur Geburt wieder normal entwickelte Lungen. *Jmjd6*^{-/-} Embryonen waren deutlich kleiner und blasser (Kunisaki et al, 2004).

Jmjd6 Expression im Mausembryo

Trotz der gravierenden Anomalien in homozygoten *Jmjd6*^{-/-} Mäusen, waren heterozygote *Jmjd6*^{+/-} Mäuse lebensfähig und wiesen keine erkennbaren Missbildungen auf. Mittels "Northern Blot" Ana-

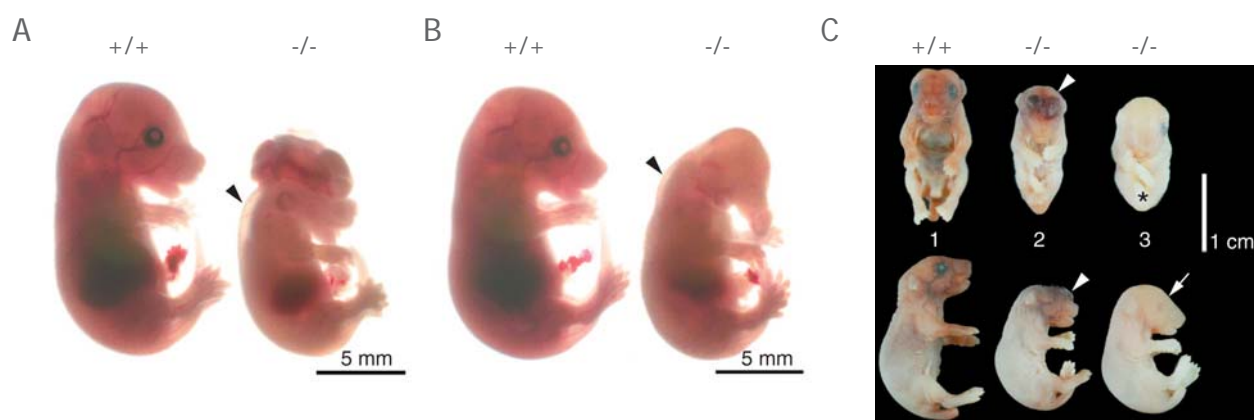


Abb. 01 | *Jmjd6*-“knock-out” Mäuse: Homozygote *Jmjd6*^{-/-} Mäuseembryos zeigen dramatische Entwicklungsdefekte in verschiedenen Organen und sterben perinatal. Embryos am Tag E15,5 (A, B) und zum Zeitpunkt der Geburt (C) zeigen z.B. Exencephalie (A) oder ein bzw. zwei fehlende Augen (A, B, C), abnormale Kopfformen (B), Ödeme (Pfeilspitzen in A, B) und generelle Blutarmut (3 in C) (Böse et al, 2004).

lyse konnte Jmjd6 mRNA in den heterozygoten Embryonen frühestens ab Tag E7 nachgewiesen werden. Jmjd6 Transkripte waren in verschiedensten Geweben, wie Gehirn, Auge, Rückenmark, Thymus, Lunge, Leber, Niere und Darm nachweisbar (Li et al, 2003). Auch Böse et al konnten mit RT-PCR Jmjd6 Expression in allen embryonalen Entwicklungsstadien aufzeigen. Dabei war das Expressionsniveau zu verschiedenen Zeitpunkten in den unterschiedlichen Organen variabel. Mit Hilfe einer "Jmjd6- β -geo gene-trap"-Reporter-Mauslinie, welche β -Galactosidase in der 3'-Region des Jmjd6-Gens inseriert hatte, konnten sie zeigen, dass am Tag E10,5 die Jmjd6-Expression besonders hoch im sich entwickelnden Nervensystem, in den Augen und den sich bildenden Extremitäten ist. Ab E12,5 war die stärkste β -Galactosidase-Aktivität in den Augen, im Neuralrohr und im Gehirn zu beobachten (Böse et al, 2004).

Phagozytose in Jmjd6^{-/-} Mausembryonen

Die Ergebnisse aller drei knock-out-Experimente legen nahe, dass Jmjd6 eine bedeutende Rolle bei der Gewebedifferenzierung während der Embryonalentwicklung spielt. Widersprüchliche Angaben wurden aber über die Ursache der schweren Entwicklungsdefekte bei den Jmjd6^{-/-} Mäusen gemacht. Nur zwei der drei Jmjd6^{-/-} Mäuse zeigten Defekte bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen (Li et al, 2003; Kunisaki et al, 2004). So konnte in beiden Fällen eine stark gestiegene Anzahl an apoptotischen (TUNEL-positiven), nicht phagozytierten Zellen in verschiedenen Organen, wie etwa Leber und Thymus (Kunisaki et al, 2004), sowie Lunge, Netzhaut oder Mittelhirn (Li et al, 2003) festgestellt werden. Böse et al dagegen fanden in ihrer "knock-out" Maus weder einen Hinweis auf eine abnormale Phagozytose von apoptotischen Zellen, noch konnten sie eine erhöhte Apoptoserate feststellen. Auch in-vitro-Vergleiche von Macrophagen aus fötaler Leber von homozygoten "knock-out" Mäusen mit Macrophagen aus Wildtyp-Mäusen zeigten bei der Phagozytose von apoptotischen Thymozyten keinen Unterschied (Böse et al, 2004). Böse et al waren sich deshalb sicher, dass Jmjd6 zwar eine entscheidende Rolle bei der Gewebedifferenzierung spielt, Jmjd6 aber nichts mit dem Prozess der Erkennung und Aufnahme von apoptotischen Zellen zu tun hat.

Desweiteren gaben sie einen ersten Hinweis darauf, dass Jmjd6 nicht, wie ursprünglich angenommen, das Antigen des Antikörpers mAb217 sein konnte. Immunohistochemische Färbungen mit mAb217 an Wildtyp- und Jmjd6^{-/-} Macrophagen und Fibroblasten zeigten identische Signale (Böse

et al, 2004). Einen weiteren Hinweis lieferten Mitchell et al 2006 mit Versuchen an $Jmjd6^{-/-}$, $Jmjd6^{+/-}$ und $Jmjd6^{+/+}$ embryonalen Mausfibroblasten. Alle drei Zelllinien waren gleichermaßen in der Lage, apoptotische Zellen zu erkennen und zu phagozytieren (Mitchell et al, 2006). Sie widersprachen damit ihren eigenen Ergebnissen aus dem Jahre 2004 (Li et al, 2004).

Jmjd6-“knock-down” im Zebrafisch

Die Bedeutsamkeit von Jmjd6 für die Morphogenese bestätigte sich auch bei “knock-down” Experimenten am Zebrafisch-Homolog (zfpsr; Hong et al, 2004). Durch Injektion von Jmjd6-Morpholinos konnte die Jmjd6 (zfpsr) -Expression auf etwa 10% des Normalniveaus gesenkt werden. Drei Tage nach Befruchtung (3 dpf) waren 15% der Jmjd6-defizienten Embryonen nicht mehr lebensfähig, 28% zeigten schwere, 47% leichte Entwicklungsdefekte, 10% entwickelten sich normal. Schwere Anomalien waren charakterisiert durch ein kleineres Gehirn als in Kontrollembryonen, Somiten entwickelten sich nicht und die Embryonen waren nicht in der Lage 3dpf zu schlüpfen. In allen defekten “knock-down“-Phänotypen entdeckten die Forscher vermehrt nicht phagozytierte apoptotische Zellen im Bereich der Chorda dorsalis, die in den Wildtyp- oder Kontroll-Embryonen in dieser Menge nicht gefunden werden konnten (Hong et al, 2004).

Die Bedeutung von Jmjd6 für die Embryonalentwicklung wurde auch in Invertebraten untersucht. Interessanterweise zeigten dort Jmjd6-defiziente Tiere keine Entwicklungsdefekte.

1.3 JMJD6-“KNOCK-OUT” EXPERIMENTE IN INVERTEBRATEN

Das Jmjd6-Homolog in *C. elegans* (PSR-1) weist 56% identische und 72% ähnliche Aminosäuren zum humanen Jmjd6 auf und rekombinantes *C. elegans* Jmjd6 aus *E.coli* hat eine deutlich höhere Affinität zu PS, als zu Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylcholin (PC) im ELISA Experiment (“enzyme linked immunosorbent assay”; Wang et al, 2003). Der *C. elegans* Stamm tm469 besitzt eine “Jmjd6-loss-of-function” Mutation; ihm fehlt bis auf die ersten 14 Aminosäuren das gesamte Jmjd6 Protein. In allen embryonalen Entwicklungsstadien von tm469

konnten mehr nicht-phagozytierte apoptotische Zellen beobachtet werden als in Kontroll-Embryos. 4D-Mikroskopie Analysen ergaben, dass apoptotische Zellen im Schnitt 55% länger im Embryo erhalten blieben. Bei Überexpression von Jmjd6 (PSR-1) in tm469 waren die Phagozytosedefekte nicht mehr zu sehen (Wang et al, 2003). In einem zweiten unabhängigen Jmjd6-RNAi Experiment in *C. elegans* konnten dagegen keine signifikanten Phagozytose-Defekte registriert werden (Arur et al, 2003). In beiden Fällen waren keine deutlichen morphologischen Anomalien an den Jmjd6 defizienten Tieren zu erkennen.

Ähnlich den *C. elegans* Mutanten waren bei homozygoten Mutanten einer *Drosophila* Jmjd6 Deletion-smutante (dPSR^{FM1}), der die ersten 210 Aminosäuren des *Drosophila* Jmjd6-Homologs fehlen, keine offensichtlichen morphologischen Defekte zu sehen. Die Mutanten waren lebensfähig, fruchtbar und es konnte kein Hinweis für einen Phagozytose-Defekt in den Tieren festgestellt werden (Krieser et al, 2007). Dagegen wurde gezeigt, dass Jmjd6 Überexpression in *Drosophila* Apoptose inhibiert. In den Augen von transgenen Fliegen mit Jmjd6 unter der Kontrolle eines GAL4-UAS System wurde gleichzeitig mit Jmjd6 das pro-apoptotische Protein HID ("Head involution defective") überexprimiert. HID Überexpression alleine führt in *Drosophila* zu verkleinerten, deformierten Augen. Dieser Effekt konnte durch Überexpression von Jmjd6 vermindert werden. In homozygoten Jmjd6^{-/-} Mutanten dagegen war der Augendefekt durch HID Überexpression deutlich stärker. In Folge dessen wurde Jmjd6 (dPSR) nun ein inhibitorischer Effekt auf Apoptose im *Drosophila* Auge zugeschrieben (Krieser et al, 2007).

1.4 DOMÄNENSTRUKTUR DES JMJD6-PROTEINS

Neben den kontroversen Aussagen über die Funktion von Jmjd6 in der Phagozytose von apoptotischen Zellen (siehe 1.2 & 1.3) gab es auch Unstimmigkeiten über die Lokalisation in der Zelle. War es ursprünglich als Rezeptor in der Zellmembran klassifiziert worden (Fadok et al, 2000), so konnte Jmjd6-GFP Fusionsprotein in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien ausschließlich im Zellkern detektiert werden (Cui et al, 2004). Dafür wurden fünf Kernlokalisationssignale (NLS) im humanen Jmjd6 identifiziert, die jedes für sich ausreichend waren, um Jmjd6 in den Kern von

HeLa Zellen zu leiten (Cui et al, 2004). Auch in *Drosophila* ließ sich ECFP-markiertes Jmjd6 (dPSR^{FM1}) ausschließlich im Kern nachweisen (Krieser et al, 2007). Dasselbe galt für Jmjd6-GFP im frühen Metazoen *Hydra vulgaris*, in dessen Jmjd6 Sequenz drei der fünf humanen NLS konserviert sind (Cikala et al, 2004). Basierend auf bioinformatischer Analyse konnten in der Jmjd6-Sequenz von *Hydra* bis Mensch ein potentielles DNA-Bindemotiv (AT-hook), eine serinreiche Sequenz mit bis dato unbekannter Funktion und eine Jumonji (JmjC) Domäne identifiziert werden (Cikala et al, 2004). Bei neuerlicher Untersuchung von humaner und muriner Jmjd6-Sequenz kamen kürzlich noch eine Sumoylierungssequenz und ein Kern-Export-Signal (NES) hinzu (Hahn et al, 2008; siehe Abb. 02). Die ursprünglich prognostizierte Transmembrandomäne (Fadok et al, 2000) konnte bei keiner späteren Untersuchung identifiziert werden.

1.4.1 JmjC DOMÄNE

Die Jumonji-C (JmjC) Domäne wurde erstmals in den Proteinen Jarid2 (Jumonji), Jarid1C (Smcx) und Jarid1A (RBP2) aufgrund von Sequenzähnlichkeiten beschrieben. Jarid2 wurde ursprünglich in einem "gene-trap" Experiment bei der Suche nach wichtigen Genen für die Morphogenese des Gehirns identifiziert (Takeuchi et al, 1995). Aufgrund von Sequenzhomologien wurde die JmjC-Domäne später in mehr als 100 weiteren Proteinen von Hefe bis Mensch gefunden (Clissold & Ponting, 2001). Mittlerweile konnte mit Hilfe kristallographischer Untersuchungen und Sequenzanalysen aufgeklärt werden, dass eine Vielzahl der JmjC-Proteine Sekundärstruktur und Charakteristika einer cupinähnlichen Enzymfamilie, der Eisen(II)-2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen, besitzt (siehe 1.5).

Die JmjC-Domäne im Jmjd6 liegt zentral und nimmt mehr als ein Drittel der Gesamtsequenz ein. Sie ist von *Hydra* bis Mensch stark konserviert (siehe Abb. 02). Eine prognostizierte Sekundärstruktur der JmjC-Domäne des *Hydra* Jmjd6 zeigte starke Ähnlichkeit zur "jelly-roll" Struktur der 2-OG-Dioxygenase FIH (siehe 1.5.2). Die Anordnung der β -Stränge war vergleichbar und auch die zur Stabilisierung der fassähnlichen Struktur der β -Faltblätter notwendigen hydrophoben Aminosäuren waren in beiden Proteinen konserviert (Cikala et al, 2004; siehe Abb. 03). Da auch die typische Fe(II)-bindende Aminosäure-Kombination zu finden war (H187-X-D189...H272), prognostizierte man für das *Hydra* Jmjd6 Protein eine 2-OG-Dioxygenaseaktivität. Man widersprach damit der ursprünglichen Theorie, dass es ein Phosphatidylserin-Rezeptor in der Plasmamembran war. Die vorhergesagte

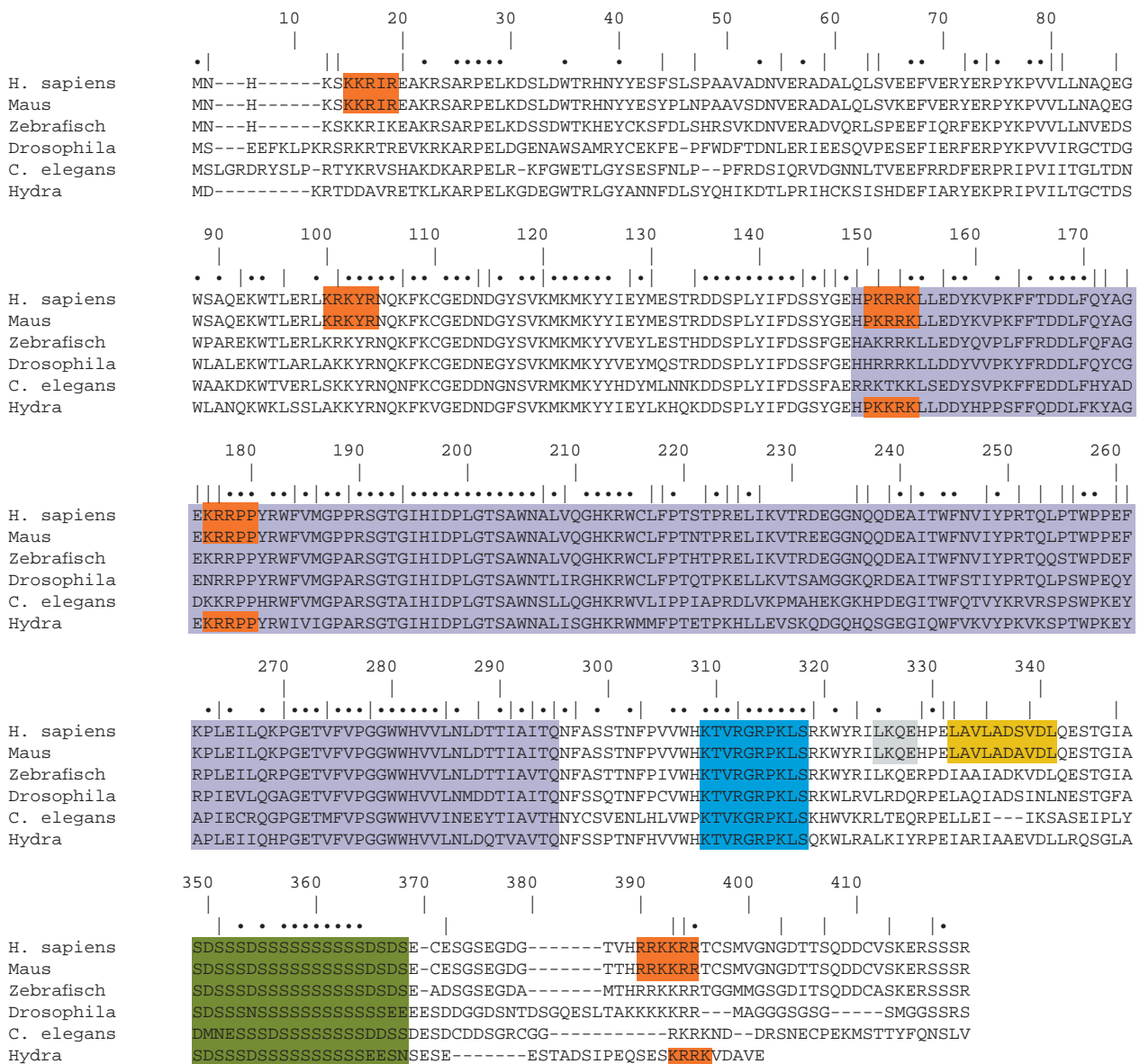


Abb. 02 | Jmjd6-"Alignment": Das Jmjd6 Protein ist von Hydra bis Mensch sehr gut konserviert. Die JmJC-Domäne macht etwas mehr als ein Drittel des Gesamtproteins aus und liegt zentral. Die Funktionalität der Kernlokalisierungssignale (NLS) konnte für humanes und Hydra Jmjd6 nachgewiesen werden (Cui et al, 2004; Cikala et al, 2004). "AT-hook", Kern-Export-Signal, Poly-S Region und der Sumoylierungssequenz konnten bisher noch keine Funktionalität nachgewiesen werden.

- NLS (Kernlokalisierungssignal)
- JmJC-Domäne
- Poly-S-Region
- "AT-hook"
- Sumoylierungssequenz
- NES (Kern-Export-Signal)

Ähnlichkeit zu FIH wurde durch die phylogenetischen Untersuchungen und Sequenzanalysen von Klose et al indirekt bestätigt. Sie gruppieren Jmjd6 und FIH gemeinsam mit sechs anderen Proteinen unbekannter Funktion in die Gruppe der "JmjC-domain only" Proteine (Klose et al, 2006a; siehe Abb. 06).

1.4.2 SUMOYLIERUNG

Das SUMO ("small ubiquitin-related modifier") Protein wirkt als post-translationale Modifikation an mehreren 100, hauptsächlich nukleären Proteinen. Es ist etwa 10 kD groß und seine 3D-Struktur ähnelt stark der des Ubiquitins, obwohl weniger als 20% der Aminosäuresequenz identisch sind (Bayer et al, 1998; Bernier-Villamor et al, 2002). Hefe, *C. elegans* und *Drosophila* haben jeweils ein SUMO-Gen, während Pflanzen und Vertebraten mehrere SUMO-Gene besitzen. Beim Menschen wurden vier Gene identifiziert (Melchior F, 2000; Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). Das SUMO-Protein wird über eine Peptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin im SUMO und einer ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Zielprotein mit eben diesem verbunden. Dabei konnte eine konservierte SUMO-Akzeptorsequenz identifiziert werden, die Π -K-X-E lautet. Dabei steht Π für eine aliphatische Aminosäure mit verzweigter Seitenkette und X für eine beliebige Aminosäure (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). Durch die Sumoylierung eines Proteins verändert sich dessen Oberfläche, was meist Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst, was wiederum dessen Stabilität, Lokalisation oder Aktivität verändern kann. So kann z.B. sumoyliertes PCNA in Hefe die DNA-Helikase Srs2 an die



Abb. 03 | Konservierte Aminosäurereste zwischen FIH-1 und Hydra Jmjd6: Sekundärstruktur der JmjC-Domäne des humanen FIH-1. Die für die beta-Faltblätter strukturell wichtigen Aminosäuren sind zwischen humanem FIH-1 und Hydra Jmjd6 konserviert (rosa). Auch das charakteristische Tripeptid H-x-D/E...H ist in Hydra Jmjd6 vorhanden (lila) (Cikala et al, 2004).

Replikationsgabel rekrutieren (Pfander et al, 2005). Reguliert wird die Sumoylierung meist durch andere post-translationale Modifikationen im Zielprotein. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. Phosphorylierungen in p53, c-Fos oder c-Jun die Sumoylierung des Proteins negativ regulieren (Lin et al, 2004; Bossis et al, 2005). Alternativ kann auch eine andere post-translationale Modifikation wie z.B. eine Acetylierung oder Ubiquitinylierung direkt am Lysin die Sumoylierung dieses Lysins sterisch verhindern (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007).

Hahn et al identifizierten mit einer Wahrscheinlichkeit von 92% im humanem Jmjd6 mit Hilfe einer "SUMOplot prediction" die Sumoylierungssequenz LKQE (siehe Abb. 02; Hahn et al, 2008). Die Sequenz erfüllt mit einem Leucin an der II-Stelle die Voraussetzungen der prognostizierten SUMO-Akzeptorsequenz (s.o.). Anders als bei den weiteren Proteindomänen im Jmjd6 ("AT-hook", JmjC) ist die Sumoylierungssequenz nur bei Mensch, Maus und Zebrafisch konserviert. In Drosophila und C. elegans fehlen Lysin und Glutamat an der besagten Stelle völlig und auch in Hydra ist die Sumoylierungssequenz nicht detektierbar.

1.4.3 "AT-hook"

Beim "AT-hook" handelt es sich um ein kurzes DNA-Bindemotiv, welches erstmals in "high mobility group" (HMG) I (Y) Proteinen beschrieben wurde (Reeves et al, 1990), mittlerweile aber in vielen anderen, meist eukaryontischen DNA-bindenden Proteinen nachgewiesen werden konnte. Der "AT-hook" kann in einer oder mehreren aufeinander folgenden Kopien im Protein vorliegen und findet sich in den meisten Fällen in Kombination mit anderen bekannten DNA-Bindemotiven, wie etwa C₂H₂-Zinkfinger oder "plant homeodomain finger" (PHD; Aravind et al, 1998). Kernsequenz des "AT-hook" bildet ein Tripeptid aus Glycin, Arginin und Prolin (GRP) welches notwendig, aber auch alleine schon ausreichend für die DNA-Bindung ist (Huth et al, 1997). Die benachbarten Aminosäuren sind weniger stark konserviert, aber meist basischer Natur. Aufgrund der Sequenzmotive werden drei "AT-hook" Gruppen unterschieden (I, II und III), die mit verschieden starker DNA-Bindeaffinität ausgestattet sind (Huth et al, 1997). Die DNA-Bindung erfolgt über eine C-förmige Struktur die in der kleinen Furche der DNA "andockt" (Huth et al, 1997; Aravind et al, 1998).

Der in Jmjd6 prognostizierte "AT-hook" (siehe Abb. 02; Cikala et al, 2004) besitzt das charakteristische Kernmotiv GRP (s.o) und scheint dadurch als DNA-Bindemotiv prädestiniert. Bisher konnte

dies aber experimentell noch nicht nachgewiesen werden. Eine humane Jmjd6-Mutante, deren GRP-Tripeptid durch ein Triplet aus Alanin (AAA) ersetzt wurde, zeigte identische Kernverteilung in HeLa Zellen wie das humane Wildtyp-Jmjd6. Auch haben in-vitro DNA-Bindetests mit DNA-Cellulose und humanem Jmjd6 keine Wechselwirkungen des Jmjd6 Proteins mit doppelsträngiger DNA bestätigen können (Diplomarbeit Corinna Schmitz, unveröffentlicht).

1.5 EISEN(II) & 2-OXOGLUTARAT ABHÄNGIGE DIOXYGENASEN

2-Oxoglutarat (OG)-abhängige Dioxygenasen umschreiben eine Enzymfamilie, die bei diversen biologischen Prozessen eine gewichtige Rolle spielt, indem ihre Mitglieder verschiedenste Oxidationsreaktionen katalysieren (Loenarz & Schofield, 2008). Alle bisher identifizierten 2-OG-Dioxygenasen benötigen Eisen(II) (FeII) als Cofaktor, manche zur optimalen Aktivität zusätzlich Ascorbat (Costas et al, 2004; Ozer & Bruick, 2007). Von einer Dioxygenase spricht man, wenn beide O-Atome des molekularen Sauerstoffmoleküls in die Produkte eingebaut werden. Bei 2-OG-Dioxygenasen wird die Oxidation des Substrats an die oxidative Decarboxylierung von 2-OG gekoppelt. Dadurch entstehen neben dem hydroxylierten Produkt Succinat und Kohlenstoffdioxid (CO₂) (siehe Abb. 04).

Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, dass die charakteristische Sekundärstruktur eine cupinähnliche Fasstruktur besitzt ("jelly-roll motif"). Acht antiparallele β -Stränge bilden hierbei zwei β -Faltblätter mit einem hochkonservierten Fe(II) Bindemotiv der Form His-X-Asp/Glu...His. Die Bindestellen für das 2-OG sind weniger stark konserviert und variieren in verschiedenen Subfamilien (Clifton et al, 2006). Im Gegensatz zu anderen Oxygenasen, wie etwa Cytochrom P450, die ein Häm b mit zentralem Eisenatom als prosthetische Gruppe besitzen, binden 2-OG-Dioxygenasen das Fe(II) direkt. Sequenzanalysen prognostizierten mehr als 60 2-OG-Dioxygenasen für den Menschen, die meisten davon bisher mit unbekannter Funktion. Pionierarbeit wurde an der Collagen-Prolyl-Hydroxylase (CPH) geleistet, die bereits 1967 als 2-OG-Dioxygenase charakterisiert wurde (Hutton et al, 1967). Hat im Falle von Kollagen die posttranslationale Hydroxylierung eine strukturelle Bedeutung, so wurden mittlerweile 2-OG-Dioxygenasen auch regulatorische Aufgaben, so etwa bei der DNA-Reparatur oder bei der Reaktion der Zelle auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen zugewiesen.

1.5.1 DNA-REPARATUR – ALKB

5-Methylcytosin ist eine bekannte epigenetische Modifikation der DNA. Andere Methylierungen in der DNA führen zu DNA-Schäden und müssen repariert werden. Die 2-OG-Dioxygenase AlkB aus *E. coli* katalysiert die Reparatur von N-alkylierter DNA mittels oxidativer Demethylierung (Falnes et al, 2002). Dabei wird die Methylgruppe der Base (z.B. Adenin) hydroxyliert. Das oxidierte Produkt ist höchst instabil und es wird sofort als Formaldehyd freigesetzt, so dass wieder die nicht-alkylierte Ausgangsbasis entsteht (siehe Abb. 05). Acht humane AlkB Homologe wurden prognostiziert. Davon konnte bisher zweien (ABH2, ABH3) ebenfalls eine Demethylaseaktivität für DNA und auch RNA nachgewiesen werden (Aas et al, 2003; Falnes et al, 2007).

1.5.2 HYPOXIEANTWORT – FIH

Im Jahre 2002 konnte erstmals einem Protein mit einer JmjC-Domäne, FIH-1 ("factor-inhibiting HIF") eine eindeutige Dioxygenaseaktivität zugeordnet werden. Humanes FIH-1 wirkt als 2-OG-Dioxygenase für einen spezifischen Asparaginrest im "hypoxia-inducible factor" (HIF) α (siehe Abb. 05; Lando et al, 2002; Hewitson et al, 2002).

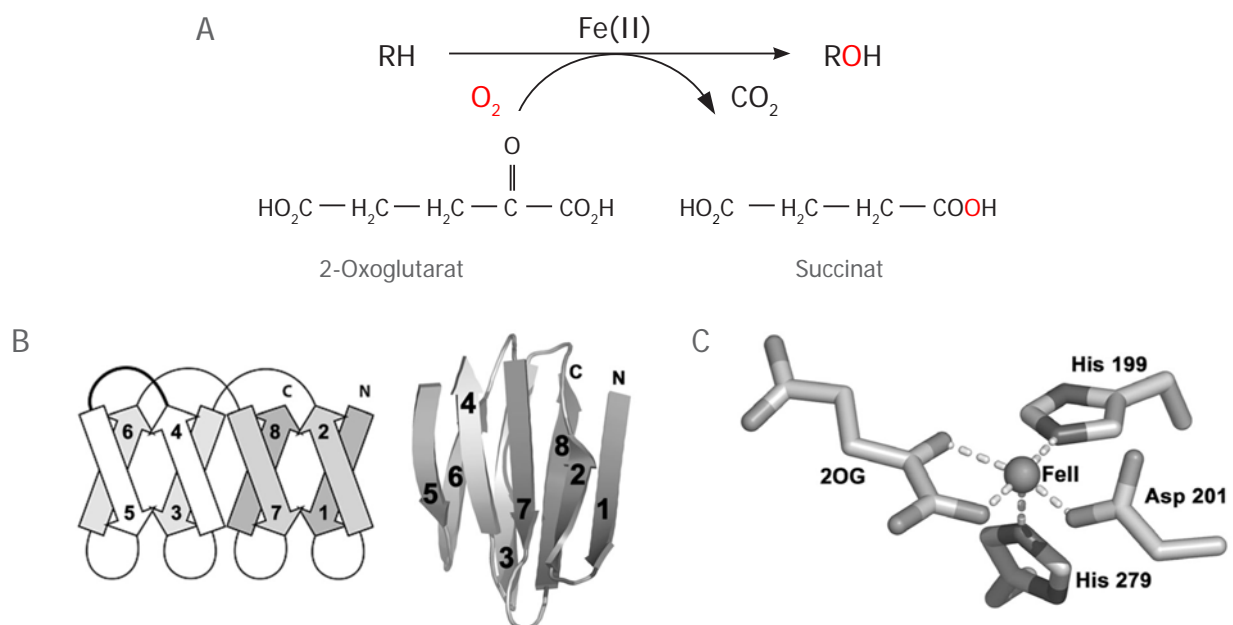
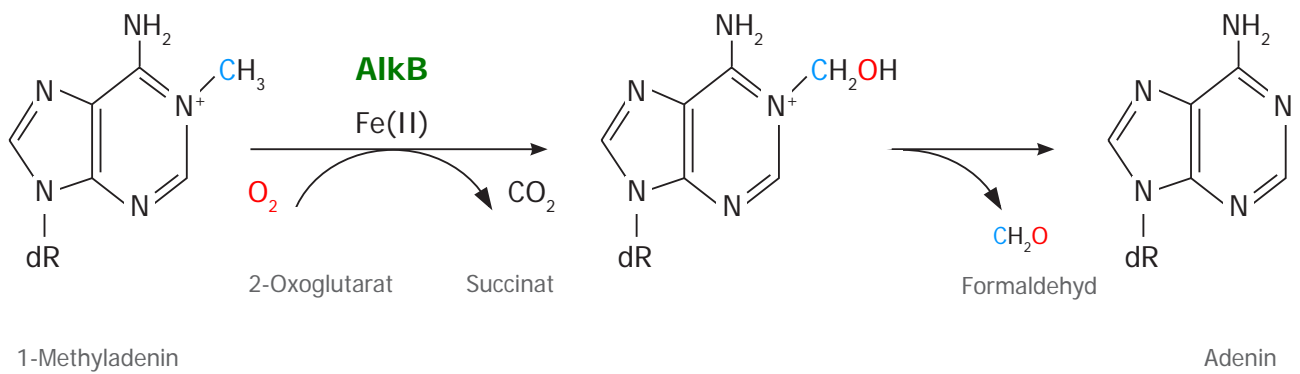
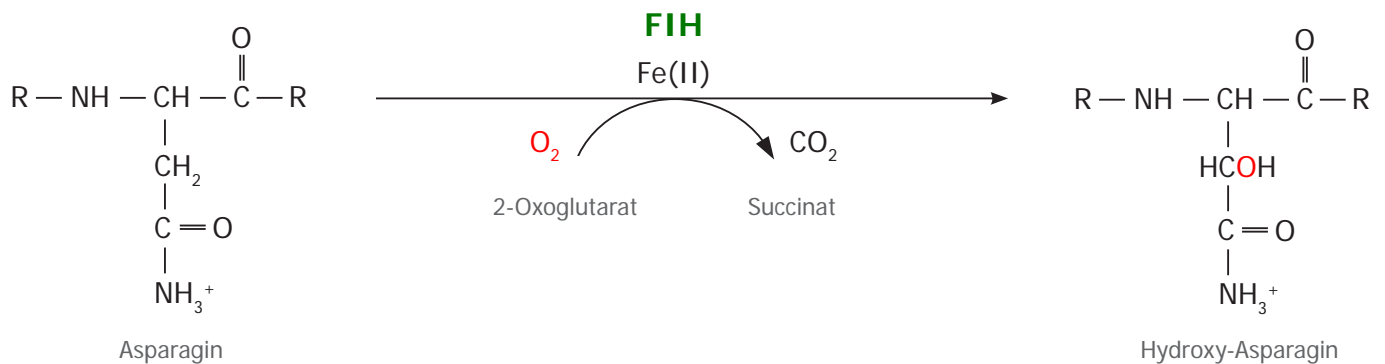


Abb. 04 | Fe(II)-2-OG-Dioxygenasen: Die Oxidation des Edukts wird bei Fe(II)-2-OG abhängigen Dioxygenasen an die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat gekoppelt. Dabei entsteht neben dem hydroxylierten Produkt Kohlenstoffdioxid und Succinat (A). Die charakteristische Sekundärstruktur der 2-OG-Dioxygenasen bildet eine fassähnliche Struktur aus acht anti-parallelen beta-Faltblättern (B) mit einem charakteristischen Fe(II)-Bindemotiv (C, hier exemplarisch gezeigt am Beispiel des FIH-Proteins) (Elkins et al, 2003).

A



B



C

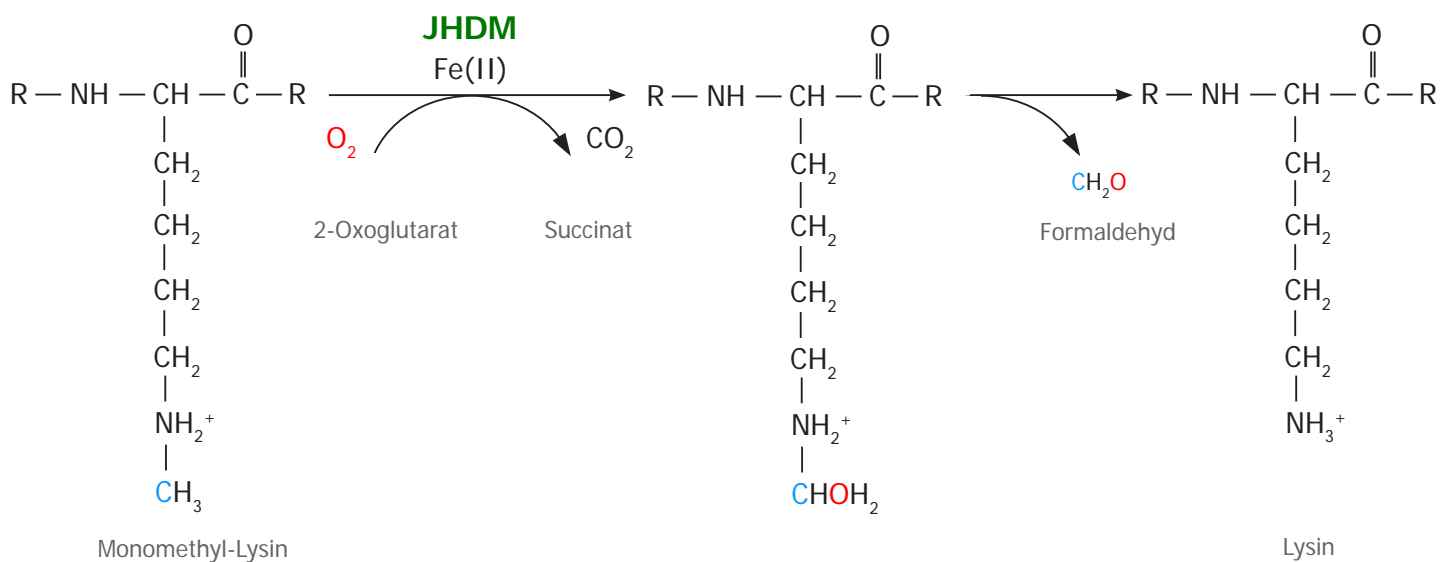


Abb. 05 | Reaktionsschemata verschiedener 2-OG-Dioxygenasen: AlkB in E.coli katalysiert die Demethylierung von DNA-Basen (A). FIH hydroxyliert einen Asparaginrest im "hypoxia-inducible factor" HIF bei Normoxie (B). JHDMs ("JmjC-domain containing histone demethylases") demethylieren spezifische Lysinreste in Histonen (C).

Der "hypoxia-inducible factor" HIF wurde als entscheidender Sauerstoff (O_2) Sensor in einem Mechanismus entdeckt, der in mehrzelligen Organismen auf Absenkungen des molekularen O_2 -Niveaus (Hypoxie) reagiert (Semenza et al, 1992; Schofield & Ratcliffe, 2004). HIF ist ein heterodimeres Protein aus zwei "Helix-Loop-Helix" (HLH) Transkriptionsfaktoren ($HIF\alpha$ & $HIF\beta$). Bei O_2 -Mangel binden die α und β Untereinheit als Dimer an DNA ("hypoxia response elements") und starten dadurch die Hypoxieantwort der Zelle. Es wurden mittlerweile ca. 100 HIF-Zielgene aus z.B. dem Energiestoffwechsel, Zellwachstum oder der Zellmigration charakterisiert.

Während $HIF\beta$ ein Kernprotein ist, wirkt $HIF\alpha$ als O_2 -Sensor im Cytoplasma. Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) wird es an zwei konservierten Prolinresten hydroxyliert. Dadurch kann das Protein pVHL (von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor) an $HIF\alpha$ binden. pVHL ist Teil eines Ubiquitin-Ligase Komplexes welcher die alpha-Untereinheit zum proteasomalen Abbau deklariert (Maxwell et al, 1999; Ivan et al, 2001; Jaakkola et al, 2001; Yu et al, 2001; Masson et al, 2001). Zusätzlich wirkt ein zweiter O_2 -abhängiger Schutzmechanismus, der die Aktivierung der Hypoxieantwort unter normalen Sauerstoffbedingungen verhindert. Hier spielt nun das JmjC-Protein FIH-1 die entscheidende Rolle. Es hydroxyliert das β -Kohlenstoffatom des Asparagin 803 (N803) der humanen $HIF\alpha$ Untereinheit bei Normoxie. Es entsteht dadurch das threo-(2S,3S) Isomer von β -Hydroxyasparagin. Diese sterische Veränderung destabilisiert die Interaktion von $HIF\alpha$ mit dem transkriptionellen Co-Aktivator p300 und die Expression Hypoxie-relevanter Gene wird unterdrückt (Lando et al, 2002; Hewitson et al, 2002). Bei Mangel an molekularem O_2 wird $HIF\alpha$ nicht hydroxyliert, dadurch nicht abgebaut, gelangt in den Kern, dimerisiert dort mit der $HIF\beta$ Untereinheit und kann mit p300 interagieren und die Genexpression startet.

Die Kristallstruktur des human FIH-1 ergab für die zentrale Domäne die typische "jelly-roll-like" β -Faltblatt-Struktur mit den konservierten Fe(II)-bindenden Aminosäuren H199-X-D201...H279 (Lee et al, 2003).

1.5.3 HISTON DEMETHYLASEN

Histonmethylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation, die abhängig von der modifizierten Aminosäureposition sowohl Transkriptionsaktivierung als auch Transkriptionshemmung bedeuten kann. Früh konnte gezeigt werden, dass die Methylierung entweder an der ϵ -Aminogruppe

eines Lysins (Murray K, 1964) oder an der Guanidinogruppe eines Arginins (Paik & Kim, 1969) stattfindet. Lysine können mono-, di- oder trimethyliert sein (Bannister & Kouzarides, 2004). Arginine dagegen können entweder mono- oder symmetrisch bzw. asymmetrisch dimethyliert sein (Bedford & Richard, 2005). War ein Lysin bzw. Arginin im Histon mal methyliert, galt es noch bis vor kurzem als irreversibel modifiziert. Histon-Demethylasen waren unbekannt, bis im Jahr 2004 mit dem Protein LSD1 ("lysine-specific histone demethylase 1") die erste wahre Histon-Lysin-Demethylase identifiziert werden konnte (Shi et al, 2004). Es handelte sich dabei um eine flavinabhängige Oxidase, die mono- und dimethyliertes H3K4 demethylieren konnte (Shi et al, 2004; Metzger et al, 2005). Der Demethylierungsprozess läuft über eine Oxidation der Aminogruppe am Lysin, bei der Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als Cofaktor benötigt wird. Formaldehyd und ein unmodifizierter Lysinrest sind die Endprodukte der Enzymreaktion.

Auf diese neue Erkenntnis folgte die rasche Identifikation einer Vielzahl weiterer Histon-Lysin-Demethylasen, die aber alle einer anderen Enzymfamilie zugeordnet werden konnten. Es waren alles JmjC-Proteine mit einer Fe(II)-2-OG-Dioxygenaseaktivität. In diesen Fällen glich die oxidative Demethylierung dem Mechanismus der für die 2-OG-Dioxygenase AlkB aus *E.coli* schon für die Demethylierung von Nukleinsäurebasen beschrieben war (siehe 1.5.1; siehe Abb. 05).

Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen, Sequenzanalysen und der unterschiedlichen Domänenstruktur der JmjC-Proteine wurden sie kürzlich in sieben verschiedene Gruppen unterteilt. In sechs der Gruppen tragen die Proteine neben der JmjC-Domäne noch mindestens eine weitere bekannte funktionelle Domäne. In der siebten Gruppe sind die JmjC-Proteine zusammengefasst, die nur eine JmjC-Domäne tragen (Klose et al, 2006a). Eine aktuelle und ausführliche Übersicht über diese Einteilung und die Histon-Demethylierungsaktivität liefern die Abb. 06 & 07.

Kürzlich beschrieben Chang et al Jmjd6 als Histon-Arginin-Demethylase. In-vitro wiesen sie an Histonpeptiden mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen eine spezifische Demethylaseaktivität für Arginin R2 in Histon H3 und Arginin R3 in Histon H4 nach. Die beobachtete Demethylierung war abhängig von Fe(II), 2-Oxoglutarat und Ascorbat. In Immunfluoreszenzversuchen mit spezifischen Antikörpern gegen H3R2 und H4R3 wurde die Demethylierung in HeLa Zellen gezeigt. Eine mutierte Jmjd6-Variante mit H187A hatte keine Enzymaktivität. H187 ist die erste Aminosäure des potentiellen Fe(II) Bindemotivs H187-x-D189...H273 im Jmjd6 (Chang et al, 2007).

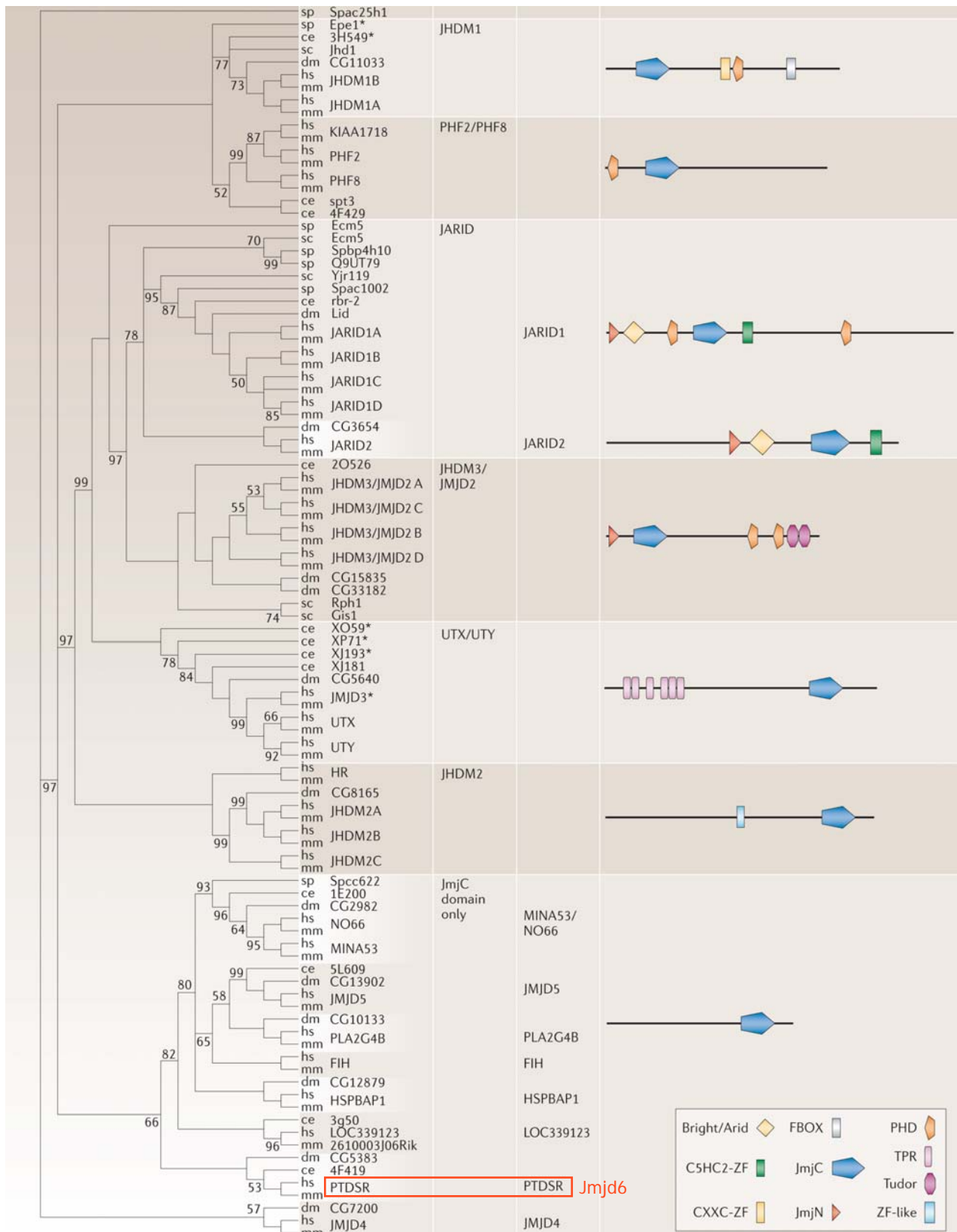


Abb. 06 | Proteine mit einer JmjC-Domäne: Die Einteilung in sieben verschiedene Gruppen erfolgte aufgrund von Sequenzanalysen und der Domänenstruktur der Proteine. Jmjd6 wurde unter anderem mit FIH zu den "JmjC-domain-only" Proteinen gruppiert. Die sechs anderen Gruppen haben neben der JmjC-Domäne noch mindestens eine weitere bekannte funktionelle Proteindomäne (Klose et al, 2006a).

1.6 ZIELSETZUNG

Zu Beginn dieser Arbeit gab es bereits starke Zweifel daran, dass Jmjd6 wirklich der Phosphatidylserin-Rezeptor in der Plasmamembran von Macrophagen ist. Die Strukturanalyse des Proteins hatte vielmehr nahegelegt, dass es sich um eine Fe(II)-2-OG-abhängige Dioxygenase handelte. Um diese Vermutung zu bestätigen, brauchte man ein Substrat für diese postulierte Enzymaktivität. Dieses sollte im Rahmen dieser Arbeit durch ein Protein-Interaktions-Experiment gefunden werden. Die Methode der Wahl war eine Tandem-Affinitäts-Reinigung. Ausserdem sollte die Funktion des Jmjd6-Proteins in Lokalisations-, Überexpressions- und "knock-down"-Experimenten untersucht werden.

Demethylase	Alternativnamen	Spezifität	demethyliert	Referenz
Flavinabhängig:				
LSD1	BHC110, AOF2	H3K4	Mono, di	Shi et al, 2004
Fe(II)-2-OG abhängig:				
JHDM1A	FBXL11	H3K36	Mono, di	Tsukada et al, 2006
JMJD1A	JHDM2A, TSGA	H3K9	Mono, di	Yamane et al, 2006
JMJD2A	JHDM3A	H3K9, H3K36	Di, tri	Klose et al, 2006b
JMJD2B	KIAA0876	H3K9	Di, tri	Fodor et al, 2006
JMJD2C	GASC1	H3K9, H3K36	Di, tri	Cloos et al, 2006
JMJD2D	KIAA0780	H3K9	Mono, di, tri	Shin et al, 2007
JARID1A	RBP2	H3K4	Di, tri	Klose et al, 2007
JARID1B	PLU-1	H3K4	Di, tri	Seward et al, 2007
JARID1C	SMCX	H3K4	Di, tri	Iwase et al, 2007
JARID1D	SMCY	H3K4	Di, tri	Lee et al, 2007
JMJD3		H3K27	Di, tri	Agger et al, 2007
UTX		H3K27	Di, tri	Agger et al, 2007
Jmjd6	PSR	H3R2, H4R3	Mono, di	Chang et al, 2007

Abb. 07 | Übersicht der Histon-Demethylasen: Histone werden an spezifischen Lysin- und Argininresten methyliert. Diese Modifikationen galten bis vor wenigen Jahren als irreversibel. Im Jahr 2004 wurde die erste wahre Histon-Demethylase entdeckt. LSD1 ("lysine-specific histone demethylase 1") gehört zur Enzymgruppe der flavinabhängigen Oxigenasen, während alle anderen Demethylasen Mitglieder der Enzymfamilie der Fe(II)-2-OG-abhängigen Dioxygenasen sind und eine JmJC-Domäne tragen.

2. ERGEBNISSE

2.1 JMJD6-EXPRESSIONSMUSTER IM KERN

Zuerst sollte die Lokalisation von Jmjd6 im Zellkern detailliert charakterisiert werden. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen und Jmjd6-GFP-Fusionsproteine untersucht. Hierfür wurden vorab verschiedene, kommerziell erhältliche anti-Jmjd6 Antikörper im "Western Blot" und in der Immunfluoreszenz an fixierten HeLa und HEK 293T Zellen getestet. Die anti-Jmjd6 Antikörper ab10526 (Abcam), H-7, D-4, APSR-14.4, N-20 (Santa Cruz) und mAb328 (Labor Andreas Lengeling, Edinburgh) färbten ausschließlich im Kern, wobei D-4, APSR-14.4, N-20 und mAb328 trotz verschiedener Fixierungsmethoden nur schwache (D-4, N-20, mAb328) bis gar keine (APSR-14.4) Immunfluoreszenzsignale in diesen Zelltypen lieferten. H-7 und ab10526 dagegen zeigten eine vergleichbare, deutliche Färbung im Kern, wobei ab10526 das intensivere Signal lieferte (siehe Abb. 08). Bei beiden Antikörpern war die Signalintensität in den HeLa-Zellen höher als in den HEK 293T Zellen. In "Western Blots" von HeLa und HEK 293T Zelllysaten ergaben die anti-Jmjd6 Antikörper identische Bandenmuster, aber in stark variierender Intensität (siehe Abb. 09). Als Schlussfolgerung dieser Antikörpertests wurden für alle weiteren Versuche die Antikörper ab10526 (Abcam) und H-7 (Santa Cruz) verwendet.

2.1.1 JMJD6-EXPRESSION IM INTERCHROMATINRAUM

Ein eukaryotischer Zellkern besteht aus zwei deutlich distinkten Kompartimenten, dem Nukleoplasma und den Nukleoli. Das Nukleoplasma lässt sich in weitere strukturell und funktionell unterscheidbare Subkompartimente unterteilen. Chromatin ist ein wesentlicher Bestandteil des Nukleoplasma. Der Großteil des Chromatins liegt in dicht gepackter, kondensierter Form (Heterochromatin) vor. Euchromatin ist dagegen die weniger dicht gepackte Chromatinform. Am Übergang zum Chromatin-freien Interchromatinraum liegt die Perichromatinregion. Hier finden RNA- und DNA-Synthese sowie ko-transkriptionelles Spleißen statt (Albiez H. et al, 2006; Fakan & van Driel, 2007).

In Interphasezellen lieferte die Jmjd6-Färbung ein punktiertes Muster im Nukleoplasma. In den Nukleoli war kein, bzw. nur vereinzelt ein sehr schwaches Signal zu erkennen (siehe Abb. 08). Der

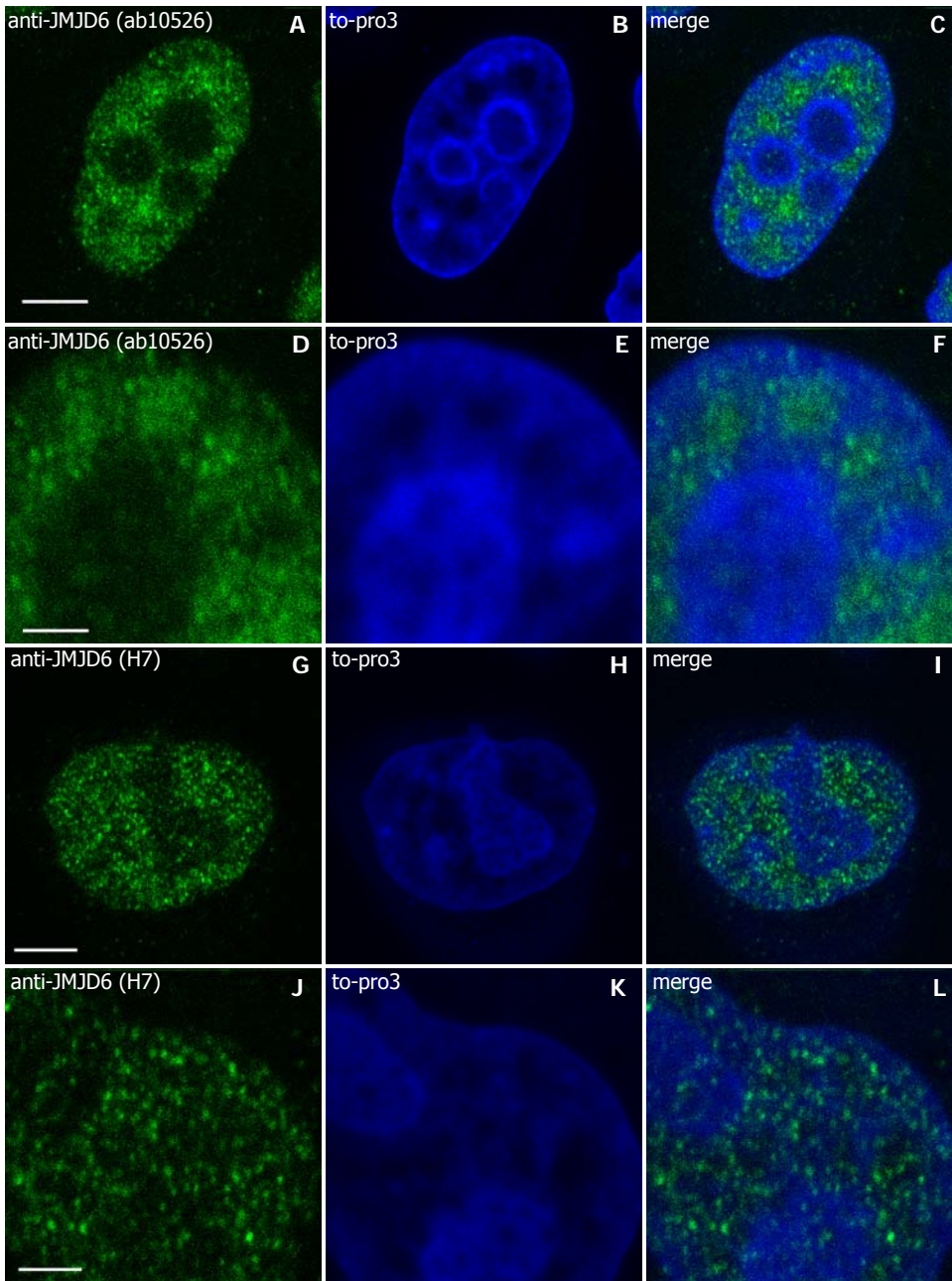
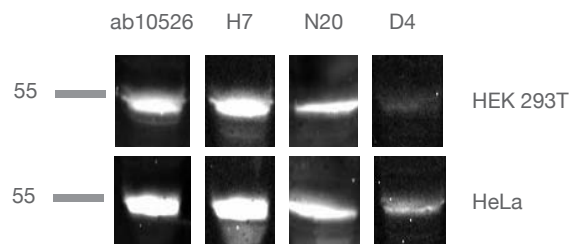


Abb. 08 | Endogenes Jmjd6 in HeLa-Zellen: Immunfluoreszenz mit zwei anti-Jmjd6 Antikörpern an fixierten HeLa-Zellen. Ab10526 (Abcam) färbt ausschließlich den Kern und hier vor allem die Interchromatinbereiche. Die Nukleoli sind größtenteils ausgespart (A-C). Vergrößerter Ausschnitt eines Kerns (D-F). Ein vergleichbares, aber weniger intensives Muster liefert der anti-Jmjd6 Antikörper H-7 (Santa Cruz; G-I). Vergrößerter Ausschnitt eines Kerns (J-L). FITC-markierter Zweitantikörper in beiden Fällen. DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab: 5 μ M (A-C, G-I); 2,5 μ M (D-F, J-L).

Abb. 09 | Anti-Jmjd6 Antikörper im "Western Blot": Gleiche Mengen Zelllysate untransfizierter HEK 293T und HeLa-Zellen wurden im "Western Blot" mit verschiedenen anti-Jmjd6 Antikörpern inkubiert. Die Antikörper APSR-14.4 (santa cruz) und mAb328 (Labor Andreas Lengeling) ergaben kein Signal. Ab10526 (abcam), H7, N20 und D4 (santa cruz) zeigten eine Bande bei ca. 53 kD, wobei D4 ein deutlich schwächeres Signal lieferte.



DNA-Farbstoff to-pro3 (Invitrogen) wirkt durch Interkalation in die doppelsträngige DNA. Diese Einlagerung ist sequenzunspezifisch (Petty et al, 2000). Somit handelt es sich bei Chromatinregionen mit starker to-pro3 Färbung um Bereiche dicht gepackter DNA (Heterochromatin). Weniger stark gepackte DNA (Euchromatin) findet man in Bereichen schwacher to-pro3 Färbung (Gilbert et al, 2004). Vergleicht man die to-pro3 Färbung mit der Jmjd6 Antikörperfärbung so ergab sich ein reziprokes Erscheinungsbild. Bereiche mit starker to-pro3 Färbung waren nahezu Jmjd6 frei, wohingegen im Interchromatinraum besonders starke Jmjd6 Signale zu finden waren (siehe Abb. 08).

2.1.2 KOLOKALISATION VON JMJD6 MIT SC35-DOMÄNEN

Im Interchromatinraum eines eukaryontischen Interphasekerns lassen sich ca. 10-30 diskrete Subkompartimente, die sog. SC35-Domänen ("nuclear speckles" oder "interchromatin granule clusters") definieren. In diesen Domänen treten neben dem namensgebenden SR-Protein SC35 (Fu & Maniatis, 1990) noch viele andere Proteine der pre-mRNA Prozessierungsmaschinerie, z.B. Spleißfaktoren und 3'-Prozessierungsfaktoren, aber auch Transkriptionsfaktoren und hyperphosphorylierte RNA-Polymerase II gehäuft auf (Saitoh N et al, 2004; Lamond & Spector, 2003; Hall LL et al, 2006). Mit Hilfe

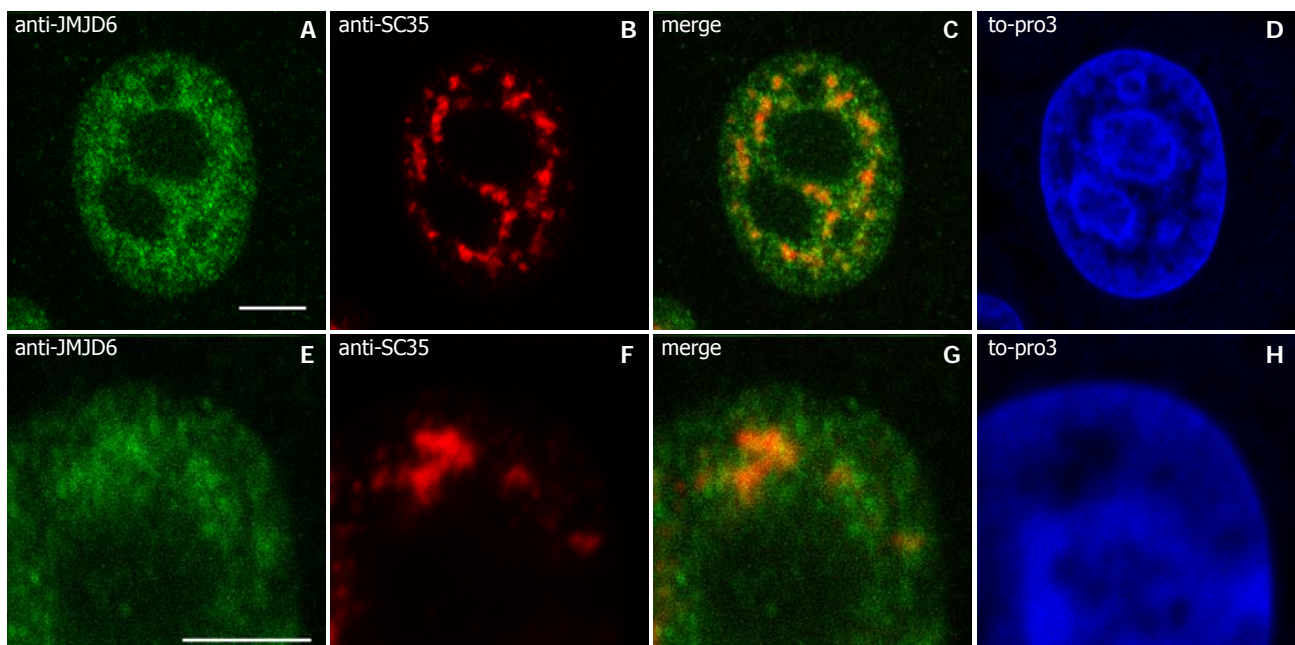


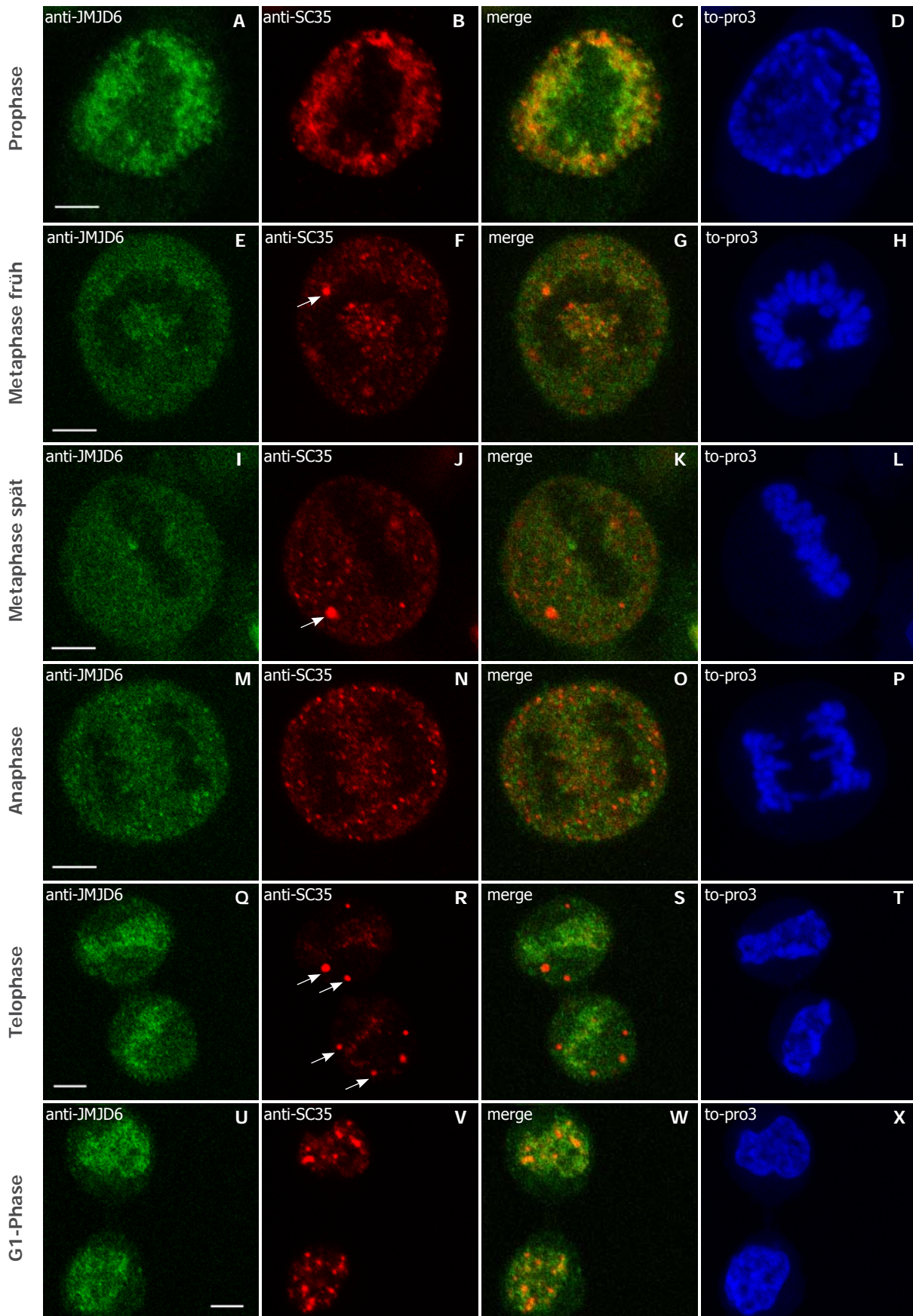
Abb. 10 | Jmjd6 Kolokalisation mit SC35-Domänen in HeLa Zellen: Eine Doppelfärbung mit anti-Jmjd6 Antikörper ab10526 (Abcam; FITC-markierter Zweitantikörper) und mit anti-SC35 Antikörper ab11826 (Abcam; Cy3-markierter Zweitantikörper) zeigte, dass das Jmjd6 Signal besonders in den SC35-Domänen stark ist (A-D). Vergrößerter Ausschnitt eines Kerns (E-H). DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab: 5 μ M

eines Antikörpers gegen SC35 lassen sich diese Domänen sichtbar machen. Die Färbungen mit anti-Jmjd6 Antikörpern zeigten ein verstärktes Auftreten von endogenem Jmjd6 im Interchromatinraum. Durch die Doppelfärbung mit anti-SC35 Antikörper konnte die Expression noch genauer detektiert werden. Es gab nur eine partielle Kolo-kalisation von Jmjd6 mit SC35-Domänen in HeLa-Zellen (siehe Abb. 10). Für viele Proteine der SC35-Domänen konnte in der Mitose ein vergleichbares Verhaltensmuster gezeigt werden. Mit dem Zusammenbruch der Kernmembran verteilen sich die Proteine diffus im Cytoplasma. Schon in der Metaphase beginnen sich die Proteine aber in sog. MIGs ("mitotic interchromatin granules") anzureichern. Die Anzahl und Größe der MIGs nimmt mit fortschreitender Mitose zu. In der Telophase kehren die Proteine dann in scheinbar abgestimmter Reihenfolge aus den MIGs in die neugebildeten Tochterkerne zurück (Prasanth KV et al, 2002; Lamond & Spector, 2003). Jmjd6 war in der Prophase noch deutlich im Interchromatinraum zu sehen (siehe Abb. 11 A-D). In Meta- und Anaphase war das Jmjd6-Signal dagegen deutlich schwächer und gleichmäßig diffus in der Zelle verteilt, bevor es dann in der Telophase in den neugebildeten Tochterkernen wieder auftauchte (siehe Abb. 11 E-X). Vergleicht man Jmjd6 mit der anti-SC35 Antikörperfärbung während der Mitose, so erkannte man keine Anreicherung von Jmjd6 in MIGs. In der Telophase befand sich SC35 noch nahezu komplett in MIGs während Jmjd6 schon wieder größtenteils in den Tochterkernen zu finden war (siehe Abb. 11 Q-T).

2.1.3 JMJD6-VERTEILUNG IM KERN IST RNA ABHÄNGIG

Die Jmjd6 Verteilung wurde durch Inkubation mit RNase A verändert (siehe Abb. 12). Jmjd6 verhielt sich damit wie das Sm-Protein Y12 und andere Spleiß-assoziierte Proteine, die eine diffuse Verteilung im Kern nach Behandlung mit RNase zeigten (Spector DL et al, 1991). Die Verteilung von SC35 änderte sich dagegen nicht (Spector DL et al, 1991).

Abb. 11 | JMJD6 und SC35 während der Mitose: Immunfluoreszenz mit dem anti-Jmjd6 Antikörper ab10526 (Abcam) und dem monoklonalen anti-SC35 ab11826 Antikörper (Abcam) an HeLa-Zellen in der Mitose. Prophase (A-D), frühe Metaphase (E-H), späte Metaphase (I-L), Anaphase (M-P), Telophase (Q-T), G1-Phase (U-X). Die MIGs ("Mitotic Interchromatin Granules") sind teilweise durch Pfeile markiert. DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte der Zelle/des Kerns. Maßstab = 5 µm



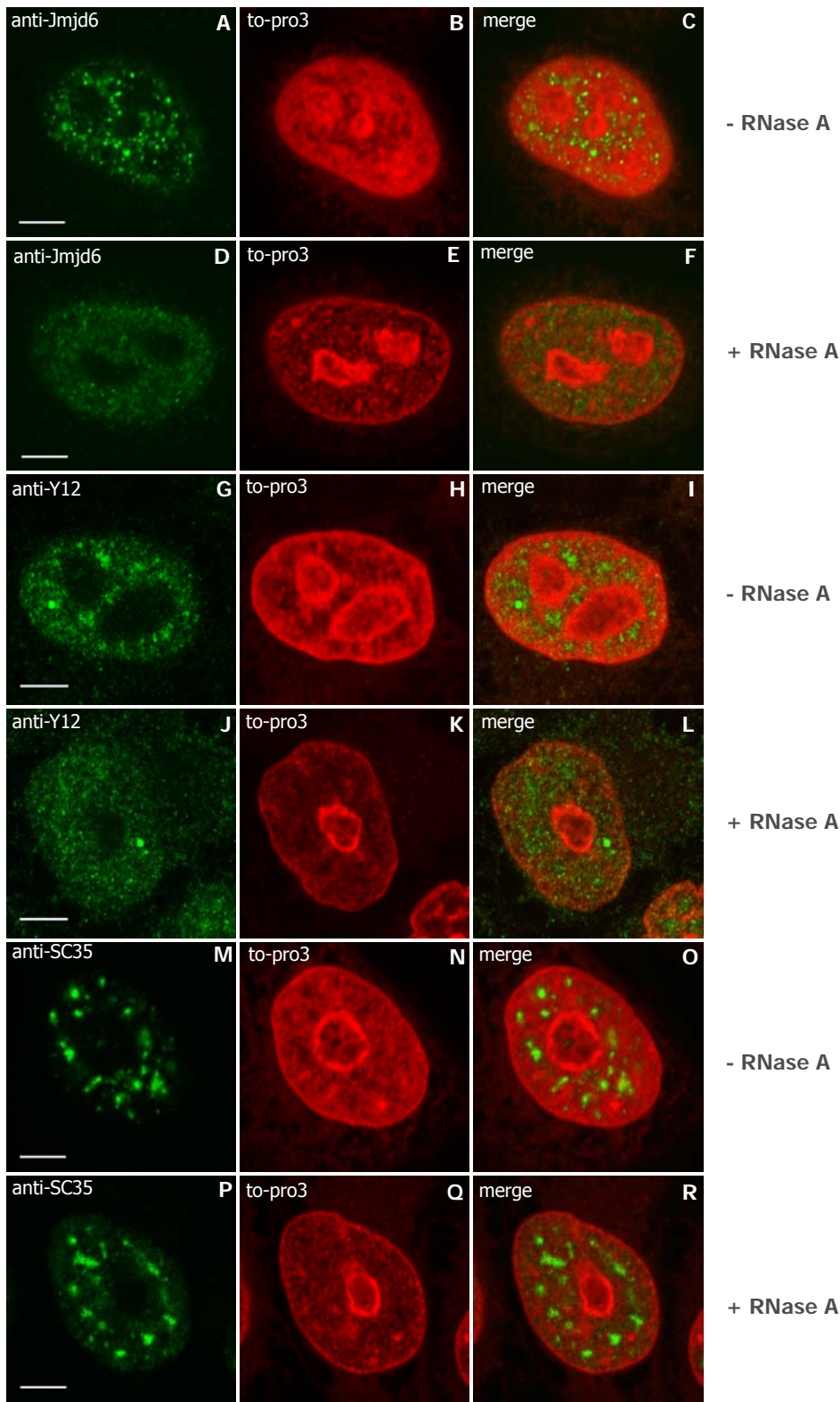


Abb. 12 | Jmjd6 nach RNase A Behandlung: HeLa-Zellen wurden 2 h mit bzw. zur Kontrolle ohne RNase A inkubiert. Die Verteilung des endogenen Jmjd6, Y12 und SC35 wurde anschließend mit Hilfe der Immunfluoreszenz in den zwei verschiedenen Zellpopulationen nachgewiesen. Jmjd6 zeigte eine deutlich veränderte diffuse Verteilung nach RNase Inkubation (D-F), im Vergleich mit unbehandelten Zellen (A-C). Die Veränderung ähnelt der des Y12-Antigens (G-L). SC35 veränderte die Verteilung nicht (M-R). DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

2.1.4 LOKALISATION VON JMJD6-GFP

Transient überexprimiertes Jmjd6-GFP oder Jmjd6-Cherry Fusionsprotein in HeLa-Zellen war ausschließlich im Kern lokalisiert. Dabei war, vergleichbar mit endogenem Jmjd6 (siehe 2.1.1), das Signal im Interchromatinraum stärker als in den Chromatinregionen des Nukleoplasma. Die Nukleoli blieben ausgespart, wobei in kleinen Teilbereichen der Nukleoli punktuell starke Färbung zu beobachten war (siehe Abb. 13). Trimethyliertes Lysin 4 von Histon 3 (TriM-H3K4) ist ein eindeutiger Marker für Euchromatin in verschiedenen Species, von Hefe (Santos-Rosa et al, 2002) bis Mensch

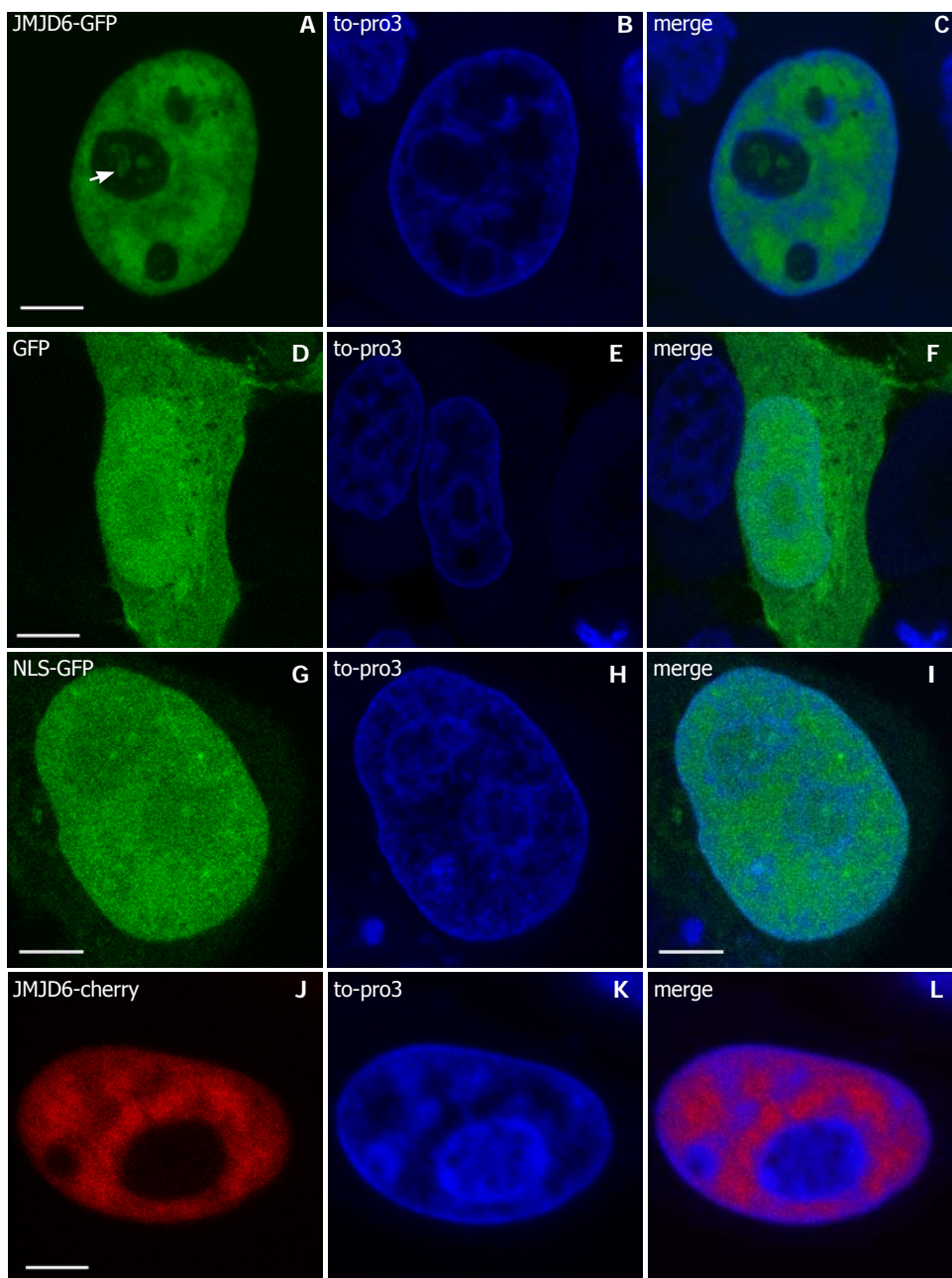


Abb. 13 | Überexpression von Jmjd6-GFP bzw. Jmjd6-cherry Fusionsproteinen: Die transiente Überexpression von Jmjd6-GFP (pEGFP-N1; A-C) und Jmjd6-cherry (pmCherry-N1; J-L) in HeLa-Zellen liefert ausschließlich im Kern Fluoreszenzsignal. Die Nukleoli sind dabei ausgespart, bzw. gibt es nur in distinkten Bereichen der Nukleoli punktuell Färbung (siehe Pfeil in A). Das Signal im Nukleoplasma ist im Interchromatinraum deutlich stärker als in Bereichen mit Chromatin. Als Kontrollen dienen der leere pEGFP-N1-Vektor (D-F) und ein GFP mit Kernlokalisationssignal (NLS; G-I). DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab: 5 μ M (A-C; G-L); 10 μ M (D-F)

(Bernstein et al, 2005). Jmjd6-GFP war nicht mit der Euchromatinfärbung des Antikörpers gegen TriM-H3K4 kolokalisiert (Corinna Schmitz, Diplomarbeit, unveröffentlicht).

Zusammengenommen assoziieren diese Ergebnisse Jmjd6 wenig mit Chromatin oder DNA, sondern eher mit RNA und Proteinen im Interchromatinraum.

2.2 IDENTIFIKATION VON JMJD6 INTERAKTIONSPARTNERN

Zum experimentellen Nachweis einer Dioxygenaseaktivität war es erforderlich, ein Substrat zu finden. Deshalb wurde nach potentiellen Interaktionspartnern von Jmjd6 gesucht. Zur Isolierung von Jmjd6 Bindepartnern aus HEK 293T Zellysatz wurde die "Tandem-Affinity-Purification-Methode" ("TAP-tag"; Rigaut et al, 1999; Puig et al, 2001) verwendet. Mithilfe der Massenspektrometrie konnten anschließend Jmjd6-Interaktionspartner identifiziert werden.

2.2.1 JMJD6 "TANDEM-AFFINITY-PURIFICATION"

Für die Tandem-Affinitätsreinigung werden Fusionsproteine aus dem spezifischen Protein von Interesse und dem sog. "TAP-tag" transient überexprimiert. Durch zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte mit verschiedenen Affinitätssäulen erlaubt das "TAP-tag" die Isolierung nativer Proteinkomplexe aus den transfizierten Zellen. Es setzt sich aus "Calmodulin-binding-protein" (CBP) und Protein A (Staphylococcus aureus) zusammen, welche durch eine TEV ("tobacco-etch-virus")-Protease-Schnittstelle getrennt sind (siehe Abb. 14). Mit einer IgG (Immunglobulin G)-Matrix gelingt es in einem ersten Schritt über Wechselwirkungen mit Protein A die Fusionsproteine aus dem

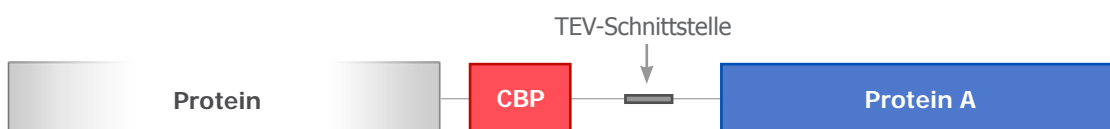


Abb. 14 | Aufbau des "TAP-tag" Fusionsprotein: Für die Tandem-Affinity-Purification-Methode ("TAP-tag") wird ein Protein mit dem Calmodulin-binding Protein (CBP) und Protein A fusioniert. CBP und Protein A sind über eine TEV-Protease Schnittstelle getrennt.

Gesamtzellextrakt zu isolieren. Nach mehreren Waschschritten löst die Zugabe von TEV-Protease das gebundene Protein proteolytisch unter nativen Bedingungen von der Matrix. Das Eluat wird nun in einem zweiten Reinigungsschritt mit einer Calmodulin-Affinitätssäule inkubiert. Unter Zugabe von Calcium (Ca^{2+}) bindet das Fusionsprotein über das CBP an die Säule. Durch Waschen werden sowohl die TEV-Protease als auch unspezifische falsch positive Proteine entfernt. Durch Elution mit EGTA erhält man letztendlich eine Proteinfraction mit Fusionsprotein und dessen potentiellen Interaktionspartnern (Rigaut G et al, 1999; Puig O et al, 2001).

Für diese "TAP-tag"-Prozedur wurde die cDNA des humanen Jmjd6 in den Vektor pECFP-N1-TAPc kloniert und anschließend in HEK 293T Zellen transient überexprimiert. Mit einem polyklonalen anti-TAP-tag Antikörper (A00683, Genscript) wurde zuerst die Verteilung des Fusionsproteins in HEK 293T Zellen kontrolliert. Die Färbung war ausschließlich im Kern und glich der Verteilung von Jmjd6-GFP (siehe Abb. 15).

TAP-tag Versuch 1:

Die theoretische Größe des Jmjd6-Proteins ist ca. 53 kD. Das "TAP-tag" hat etwa die Größe 19 kD (CBP (ca. 4 kD), TEV-Schnittstelle (ca. 1 kD) und Protein A (ca. 14 kD)). Das komplette Jmjd6-"TAP-tag" Fusionsprotein sollte also etwa eine Größe von 72 kD haben. Nach dem ersten Reinigungsschritt wurde mit Hilfe der TEV-Schnittstelle Protein A abgeschnitten. Dadurch verkleinerte sich das Fusionsprotein auf ca. 59 kD. Vergleich man die Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels (4-12%) des Zellysat-Überstandes (Input, ÜS) mit den Eluaten nach dem ersten "TAP-tag"-Reinigungsschritt

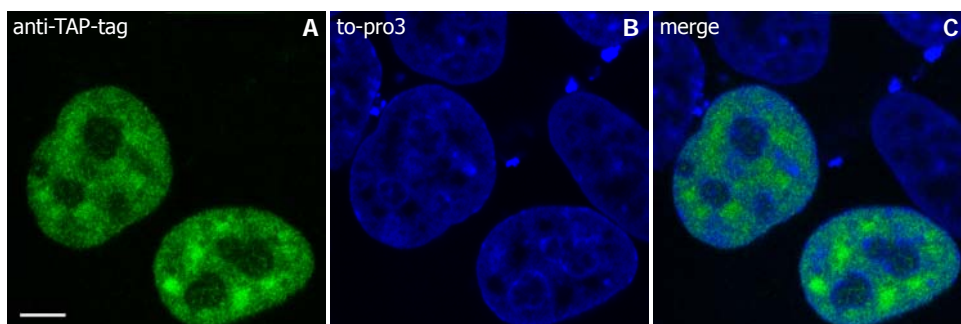


Abb. 15 | Expression des Jmjd6-TAP-tag Fusionsproteins in HEK 293T Zellen: Nach transienter Überexpression von pECFP-N1-TAPc-Jmjd6 wurden die Zellen fixiert und mit einem polyklonalen anti-TAP-tag Antikörper (A00683, Genscript) gefärbt (FITC-markierter Zweitantikörper). Das TAP-tag-Jmjd6 Fusionsprotein ist ausschließlich im Kern zu finden und die Färbung gleicht der Jmjd6-GFP, sowie der endogenen Jmjd6 Verteilung. DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μm

(IgG-Matrix, E1), bzw. nach dem zweiten Reinigungsschritt (Calmodulin-Affinitätssäule, E2) so erkannte man schon in E1 eine deutliche Anreicherung spezifischer Proteine (Proteinbanden 1-7; siehe Abb. 16 A). Im Gelbild des finalen Eluats (E2) waren sechs deutliche, klar unterscheidbare Banden zu sehen (Proteinbanden 1-6; siehe Abb. 16 C). Die Banden 5 und 6 könnten aufgrund der Größe dem Jmjd6-Fusionsprotein (ca. 59 kD) entsprechen. Die Bande 7 aus E1 fehlte in E2. Es könnte sich um TEV Protease (ca. 27 kD) handeln. Ein Western Blot mit einem anti-Jmjd6 Antikörper machte es möglich in den verschiedenen Proteinfractionen Jmjd6 nachzuweisen. In ÜS (Input) gab es eine starke Antikörperbande bei ca. 70 kD. Dies entsprach der erwarteten Jmjd6-TAP-tag Fusionsproteingröße. Zusätzlich zeigten sich Banden bei etwa 170 kD und darüber. Dieses Antikörper-Muster wiederholte sich in E1, wurde aber aufgrund der Abspaltung des Protein A nach unten verschoben. Der E1 Western Blot ließ vermuten, dass die Banden 1-6 der Coomassiefärbung allesamt ein Pendant im Blot haben und somit alle Jmjd6 enthielten (siehe Abb. 16 B). Zur genauen Charakterisierung der Proteine in den Banden 1-6 aus E2 wurden diese Banden ausgeschnitten und per massenspektrome-

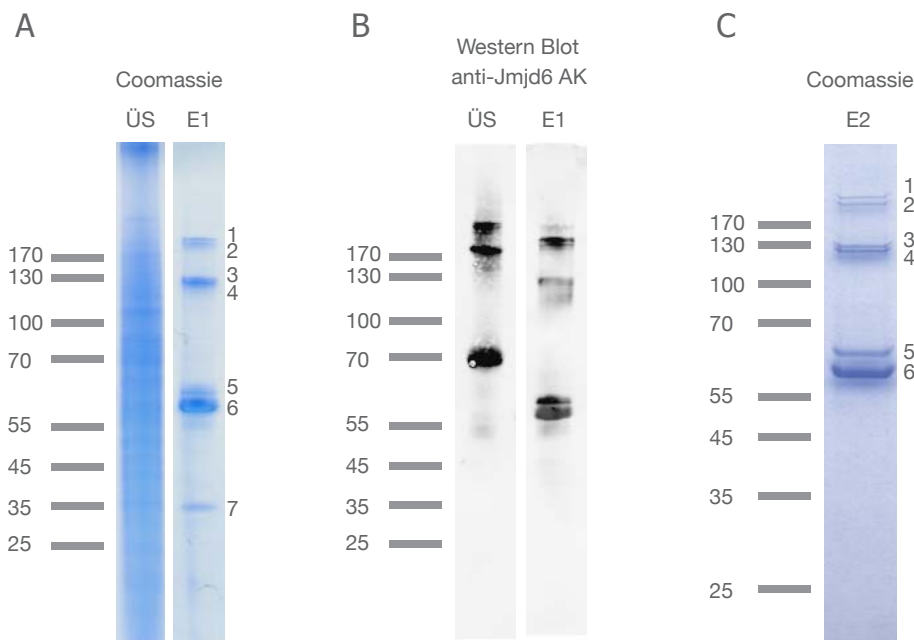


Abb. 16 | Coomassiefärbung und Western Blot nach Jmjd6-TAP-tag Reinigung: Nach der "TAP-tag" Aufreinigung wurden der "Input" (ÜS), das Eluat E1 nach dem ersten Reinigungsschritt (IgG-Matrix) und das Eluat E2 nach dem zweiten Reinigungsschritt (Calmodulinaffinitätssäule) auf ein 4-12% Polyacrylamid-Gradientengel (NuPage, Invitrogen) geladen und anschließend entweder mit colloidalem Coomassie gefärbt (A, C) oder im Western Blot mit anti-Jmjd6 Antikörper gefärbt (B). In E1 erkennt man sieben distinkte Banden (1-7; A), die sich im finalen Eluat E2 alle, bis auf eine, wiederfinden (1-6; C). Auch im Western Blot gibt es ein korrespondierendes Bandenmuster. Zur genauen Untersuchung wurden die Gelbanden aus E2 (1-6) massenspektrometrisch charakterisiert.

trischer Analyse charakterisiert. Für alle sechs Banden ergab sich das gleiche Ergebnis, Jmjd6 war in allen Fällen das mit Abstand häufigste Protein und das einzige oberhalb des Signifikanzniveaus.

Daraus ergab sich, dass zwar die Präzipitation des Jmjd6-TAP-tag Fusionsproteins sehr gut funktioniert hatte, aber Interaktionspartner konnten nicht in der Menge isoliert werden, dass sie bei Coomassiefärbung eine Bande im Gel ergaben. Desweiteren bestätigte sich die anti-Jmjd6 Antikörperfärbung aus ÜS und E1. Jmjd6-TAP-tag-Fusionsprotein hat neben der Monomerbande (ca. 59 kD in E2) Banden bei ca. 130 kD und oberhalb von 170 kD (siehe Abb. 16). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Bildung stabiler Dimere bzw. Oligomere sein. Für die strukturell verwandte Fe(II)-2-OG abhängige Dioxygenase FIH (siehe 1.5.2) ist bereits eine Homodimerisierung beschrieben worden (Lee C et al, 2003). In diesem Fall ist die Dimerisierung sogar essentiell für die Aktivität (Lancaster DE et al, 2004). Die Oligomerisierung von Jmjd6 wird unter Punkt 2.3 noch genauer analysiert.

TAP-tag Versuch 2:

Um eventuelle transiente Interaktionen von Jmjd6 mit anderen Proteinen zu stabilisieren, wurde in einem zweiten TAP-tag Ansatz N-Oxalylglycin (NOG) im Lysepuffer eingesetzt. NOG ist ein Analog zu 2-Oxoglutarat, bei dem 3-CH₂ durch NH ersetzt ist. Es ist ein effektiver Inhibitor von Fe(II)-2-OG-Oxygenasen, der 2-OG kompetitiv ersetzt. Dadurch bleibt zwar die richtige Koordinierung des Fe(II) im aktiven Zentrum erhalten (Elkins JM et al, 2003), aber NOG kann nicht oxidativ decarboxyliert werden (siehe Abb. 04) und die begonnene Hydroxylierungsreaktion stoppt und kann nicht vollendet werden (Kalliri E et al, 2005).

Man erwartete dass durch die Stabilisierung des aktiven Zentrums mit NOG eventuell auch kurzweilige Interaktionspartner in dieser Konformation "gefangen" bleiben und dadurch besser kopräzipitiert werden können. Das Ergebnis aber glich dem des ersten TAP-tag Versuchs (E2, siehe Abb. 16 C) und ergab keine zusätzlichen Proteinbanden im finalen Eluat.

2.2.2 "MULTIDIMENSIONAL PROTEIN IDENTIFICATION TECHNOLOGY" (MUDPIT)

Zur Identifizierung von eventuellen kopräzipitierten Proteinen, die im Coomassiegel nicht sichtbar waren, wurde eine sensitivere massenspektrometrische Analyse, die "Multidimensional Protein Identification Technology" (mudPIT) , durchgeführt (Washburn MP et al, 2001; Delahunty & Yates,

2005). Dabei wurde das komplexe Proteingemisch nicht über ein eindimensionales Gel, sondern über ein chromatographisches 2-Säulen-System aufgetrennt, bevor es in einem Tandemmassenspektrometer analysiert wurde (LC/LC-MS/MS). Die erste Säule war ein starker Kationenaustauscher, von dem mit steigender Salzkonzentration die Peptide eluiert wurden. Die eluierten Proteinfractionen wurden auf eine zweite Säule ("reversed-phase" Chromatographie, C₁₈) geladen und nach Hydrophobizität aufgetrennt. Die einzelnen Eluatfraktionen wurden direkt in die Ionisierungsquelle des Massenspektrometers geleitet. Diese Analyse wurde im Labor von John Yates (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) durchgeführt.

Sie zeigte im finalen Jmjd6-TAP-tag Eluat 79 signifikant relevante Proteine. Dabei war Jmjd6 das Protein mit den meisten Peptidtreffern (829) und die Gesamtproteinsequenz wurde von diesen Peptiden zu 45,4% abgedeckt. Alle 78 potentiellen Jmjd6-Interaktionspartner sind in Abb. 52, am Ende des Ergebnisteils (siehe S. 71-73) aufgelistet. In der Literatur sind einige Proteine beschrieben, die bei "TAP-tag" Versuchen immer wieder als Falsch-Positive aufgetreten sind. Dazu gehörten Hsp60- und Hsp70-verwandte Chaperone, ribosomale Proteine, verschiedene Tubuline, beta-Aktin (CAA45026) und "eukaryotic translation elongation factor 1" (NP_001393) (Rohila JS et al, 2006; Benzinger A et al, 2005; Koch HB et al, 2007). Diese Proteine und auch alle nicht-nukleären Proteine wurden für die weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Bei den verbleibenden 34 Proteinen (siehe Abb. 17) war auffällig, dass 50% dieser Proteine (17 von 34) eine Funktion im Bereich Spleißen bzw. pre-mRNA Prozessierung haben. Desweiteren sind vier nukleoläre Proteine, zwei DNA-bindende und vier Transkriptions-assoziierte Proteine identifiziert worden. Dies korrelierte sehr gut mit der beobachteten Verteilung von Jmjd6 im Kern und der partiellen Kolokalisation mit SC35-Domänen (siehe 2.1.2).

Mehr als 90% der menschlichen Protein kodierenden Gene haben Introns, die aus den Primärtranskripten durch Spleißen entfernt werden müssen, um eine funktionale mRNA zu bilden. Das Spleißosom ist ein großes Makromolekül, das sich aus mehr als 150 Proteinen und fünf "Uridine-rich small nuclear RNAs" zusammensetzt. Jede dieser RNAs bildet mit Proteinen einen sog. snRNP-Komplex (small nuclear ribonucleoprotein; U1, U2, U4, U5, U6). Zusätzlich sind eine große Zahl an nicht-snRNP-Proteinen für den Spleißprozess wichtig. Die fundamentale Spleißmaschinerie und auch der prinzipielle Ablauf sind von Hefe bis Mensch gut konserviert (Jurica MS, 2008). Die ersten essentiellen Schritte des Spleißvorgangs sind die exakte Definition der 5'- und 3'-Intron-Exon-Grenze. Das

Protein	Acc. Nr.	Funktion
hLuc7A (CROP protein)	O95232	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Putative RNA-binding protein Luc7-like 1 (hLuc7B1)	Q9NQ29	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 (hLuc7B2)	Q9Y383	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Poly-U binding splicing factor PUF60	Q9UJY7	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Splicing factor U2AF 65kD subunit	P26368	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Splicing factor U2AF 35kD subunit	Q01081	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
RNA-binding protein 39 (Splicing factor HCC1)	Q14498	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Arginine/serine-rich coiled coil protein 1	Q96IZ7	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Acinus (Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus)	Q9UKV3	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
RNA binding motif protein 25	P49756	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
RNA binding protein	Q9UQ39	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	O75400	pre-mRNA Prozessierung (Spleißen)
ATP-dependent RNA helicase DDX41	Q9UJV9	pre-mRNA Prozessierung (RNA-Helikase)
ATP-dependent RNA helicase DDX46	Q7L014	pre-mRNA Prozessierung (RNA-Helikase)
ATP-dependent RNA helicase DDX17 (p72)	Q92841	pre-mRNA Prozessierung (RNA-Helikase)
Splicing factor arginine/serine rich 11 (p54)	Q05519	pre-mRNA Prozessierung (RNA-Helikase)
Cleavage and polyadenylation specificity factor 6	Q16630	pre-mRNA Prozessierung (3'-Prozessierung)
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (Dyskerin)	O60832	Nukleolus (rRNA-Prozessierung)
Nucleolar phosphoprotein p130	Q14978	Nukleolus (rRNA-Prozessierung)
Nucleolar RNA helicase II (DDX21)	Q9NR30	Nukleolus (rRNA-Prozessierung)
Treacle protein (Treacher Collins syndrome protein)	Q13428	Nukleolus (rDNA Transkription)
Nuclease sensitive element binding protein 1	P67809	Transkription
DNA-binding protein A	P16989	Transkription
NF-kappa-B-activating protein	Q8N5F7	Transkription
Parafibromin (Cell division cycle protein 73 homolog)	Q6P1J9	Transkription
RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	Q92541	Transkription
Bromodomain-containing protein 4	O60885	DNA-Bindung
Hepatoma derived growth factor 2	Q7Z4V5	DNA-Bindung (HDGF-Familie)
Phosphatidylinositol-5 phosphate 4-kinase type II beta	P78356	Kinase, Bildung von Phosphatidylinositol-5,4-bisphosphate (Kern)
Casein kinase 2A1	P68400	Serin/Threonin-Kinase (Cytoplasma + Kern)
Hypothetical protein FLJ32377	Q96MH4	unbekannte Funktion
RNF187 protein	AAH64481.1	unbekannte Funktion
Small acidic protein	O00193	unbekannte Funktion
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	Q9BU76	unbekannte Funktion

Abb. 17 | Potentielle Jmjd6-Interaktionspartner nach TAP-tag-Versuch: Durch "MudPIT" identifizierte, im Jmjd6-TAP-tag ko-präzipitierte Proteine mit Acc.Nr. (NCBI) und aus der Literatur bekannter Funktion.

U1 snRNP lagert sich an der 5'-splice-site an. Das Protein SF1 (splicing factor 1) bindet das sog. "branch-point" Adenosin, U2AF ("U2 auxiliary factor"), ein Heterodimer aus 65 kD und 35 kD Unter-einheit bindet den "polypyrimidine tract" und die 3'-splice-site. Durch diese Anordnung kann das U2 snRNP an den "branch point" rekrutiert werden (siehe Abb. 18).

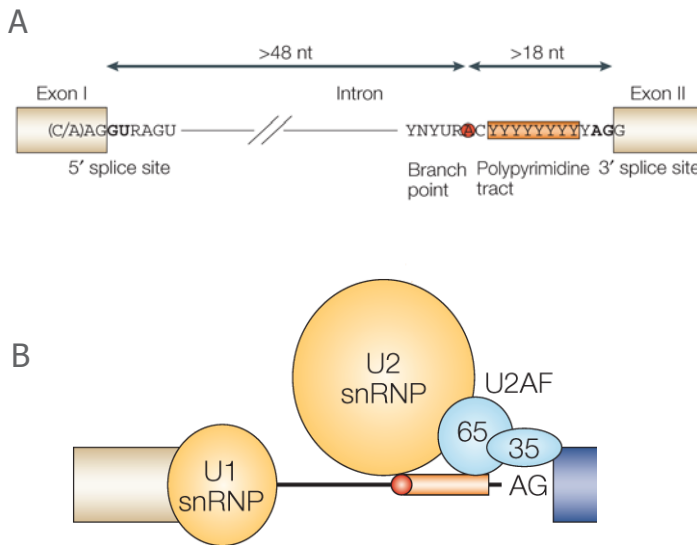


Abb. 18 | Schematische Darstellung eines Introns und des Prä-Spleißosoms: (A) Ein Intron setzt sich zusammen aus der 5'-Exon-Intron-Grenze (5'-splice-site; GU) und der 3'-Intron-Exon-Grenze (3'-splice-site; AG), sowie einem Adenosinrest im sog. "branch point" und einer Pyrimidinabfolge ("polypyrimidin tract") kurz vor Intronende.

(B) Schematische Darstellung des Prä-Spleißosoms aus U1-snRNP, U2-snRNP, U2AF65 und U2AF35.

(Abb. übernommen und leicht modifiziert nach Matlin AJ et al, 2005)

In Hefe spielt das Protein Luc7p, im Menschen das homologe hLuc7A, als Teil des U1 snRNPs eine Rolle bei der korrekten Definition der 5'-splice-site (Fortes P et al, 1999; Puig O et al, 2007). Der Mensch besitzt drei Luc7p-Homologe (hLuc7A, hLuc7B1, hLuc7B2), und alle drei tauchen im "TAP-tag" Experiment als potentielle Jmjd6-Interaktionspartner auf, ebenso das Heterodimer aus U2AF65 und U2AF35. Vergleicht man in der mudPit-Analyse Peptidanzahl und Sequenzabdeckung der Proteine, so ist U2AF65 nach Jmjd6 der zweitbeste Treffer und auch die Luc7-Varianten befinden sich im oberen Drittel (siehe Abb. 19).

Aufgrund dessen und wegen ihrer essentiellen Rolle im konstitutiven und alternativen Spleißprozess konzentrierten sich die weiteren Experimente auf U2AF65, sowie die Luc7-Varianten. Um die Interaktionen von Jmjd6 mit diesen ausgewählten Proteinen zu bestätigen, sollten sie in alternativen Experimenten ("GFP-Pulldown" und Immunpräzipitation) geprüft werden.

2.2.3 JMJD6-INTERAKTIONSTESTS NACH IMMUNPRÄZIPITATION

GFP-Nanotrap (Rothbauer et al, 2008)

Nach Überexpression von Jmjd6-GFP in HEK 293T Zellen war es mit Hilfe eines "GFP-Pulldown-Assays" (Rothbauer U et al, 2008) möglich, endogenes U2AF65, hLuc7A und hLuc7B1 spezifisch zu kopräzipitieren. Als Kontrolle fungierte die Überexpression von GFP. Nach der Präzipitation wurden die verschiedenen Fraktionen auf ein Polyacrylamidgel (12%) aufgetragen und die Interaktion mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen (siehe Abb. 20 A). Für hLuc7B2 gab es keinen Antikörper, so dass hier der Nachweis im Western Blot nicht möglich war.

Exprimierte man U2AF65-GFP und Jmjd6 (pcDNA3-Vektor) gleichzeitig in HEK 293T Zellen, so ließ sich umgekehrt bei einem U2AF65-GFP-"Pulldown" Jmjd6 kopräzipitieren (siehe Abb. 20 C).

Inwieweit die Interaktion zwischen U2AF65 und Jmjd6 RNA-abhängig ist, konnte ebenfalls mit Hilfe des "GFP-Pulldown-Assays" gezeigt werden. Bei Zugabe steigender Konzentrationen RNase A in den Lysepuffer wurde die Interaktion mit U2AF65 nach Jmjd6-"GFP-Pulldown" immer schwächer. Die Negativkontrolle, die Interaktion zwischen DNMT1-GFP und PCNA (Rothbauer U et al, 2008) blieb auch bei der höchsten RNase A Konzentration unverändert (siehe Abb. 20 B).

Immunpräzipitation mit anti-U2AF65-AK

Sowohl im "TAP-tag"- als auch im "GFP-Pulldown-Assay" (siehe 2.2.1 & 2.2.3) wurde jeweils über-exprimiertes Fusionsprotein präzipitiert. In der folgenden Immunpräzipitation mit anti-U2AF65-Antikörper gelang es endogenes U2AF65 zu präzipitieren. Hierfür wurden HeLa-Zellen lysiert und anschließend der Überstand mit anti-U2AF65-Antikörper inkubiert. Als Kontrolle wurde ein zweites Lysat ohne Antikörper inkubiert. Nach Inkubation mit Protein G Sepharose und mehreren Waschschritten

Protein	Peptidanzahl	Sequenzabdeckung
Jmjd6	829	45,4%
U2AF65	103	30%
U2AF35	4	13,8%
hLuc7A	97	13,7%
hLuc7B1	72	15,1%
hLuc7B2	421	12,2%

Abb. 19 | Ergebnis des "TAP-tag-Screens" für ausgewählte Proteine: Jmjd6 war nach MS-Analyse das Protein mit den meisten "Hits" (Peptidanzahl) und der größten Sequenzabdeckung. Die Liste zeigt Ergebnisse einiger ausgewählter, potentieller Jmjd6-Interaktionspartner.

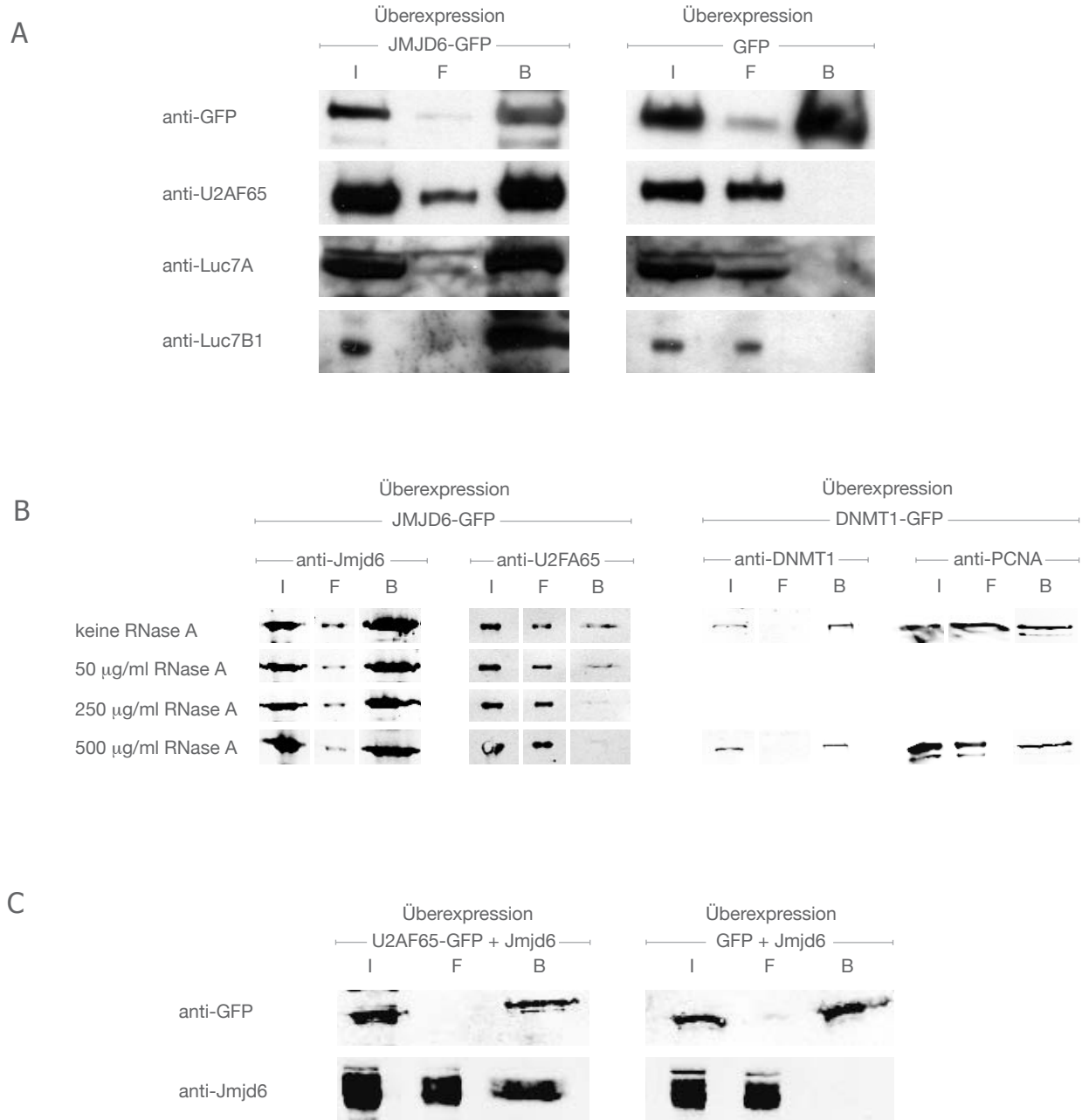


Abb. 20 | "GFP-Pulldown" von Jmjd6-GFP bzw. U2AF65-GFP: (A) In HEK 293T-Zellen wurden Jmjd6-GFP und im Kontrollansatz GFP überexprimiert. Nach Immunpräzipitation mit der GFP-Nanotrap (Rothbauer U et al, 2008) wurden die einzelnen Fraktionen auf ein Polyacrylamidgel geladen und geblottet. Mit Antikörpern wurde die Interaktion von Jmjd6 mit den Proteinen U2AF65, hLuc7A und hLuc7B1 getestet.

(B) Western Blot nach "GFP-Pulldown" von Jmjd6-GFP bzw. DNMT1-GFP unter Zugabe von RNase A in verschiedenen Konzentrationen. Die Interaktion von Jmjd6 mit U2AF65 wurde mit zunehmender RNase A Konzentration schwächer, wohingegen die DNMT1 und PCNA Interaktion unbeeinflusst blieb.

(C) Western Blot nach "GFP-Pulldown" von U2AF65-GFP bzw. GFP aus HEK 293T-Zellen, die Jmjd6 (pcDNA3) überexprimieren. Bestätigung der spezifischen Interaktion von U2AF65 und Jmjd6, da es im Kontrollexperiment (GFP) trotz Jmjd6-Überexpression keine Kopräzipitation von Jmjd6 gab.

I = Input-Fraktion (2% des Gesamtproteingehalts), F = Durchfluss-Fraktion (2% des Gesamtproteingehalts), B = Beads-Fraktion (10% des Gesamtproteingehalts).

wurde die Sepharose in Ladepuffer aufgekocht und auf ein Polyacrylamidgel (12%) geladen (siehe Abb. 21). Im Western Blot mit einem anti-Jmjd6-Antikörper wurde dann die Kopräzipitation von Jmjd6 gezeigt (siehe Abb. 22).

Diese Experimente bestätigten, dass Jmjd6 mit Proteinen des Spleißosoms interagiert und dass die Interaktion RNA-abhängig ist. Sie machen es sehr wahrscheinlich, dass Jmjd6 in den Spleißprozess involviert sein könnte.

Abb. 21 | Immunpräzipitation von endogenem U2AF65: HeLa-Zellysat wurde mit monoklonalem anti-U2AF65 Antikörper inkubiert (+). Das Kontrolllysate wurde ohne Antikörper inkubiert (-). Nach Färbung mit Colloidalem Coomassie waren auf dem Polyacrylamidgel drei Banden zwischen 55kD und 70kD zu sehen (*, **, ***), die im Kontrollansatz (-) fehlten (A). Alle drei Banden wurden auch im Western Blot mit anti-U2AF65 Antikörper detektiert (B). Im Western Blot nur mit Zweitantikörper dagegen wurde die höchste Bande bei ca. 65 kD (*) nicht mehr erkannt (C). Es muss sich hierbei also um U2AF65 handeln. Die stärkste Bande in der Coomassiefärbung bei ca. 55 kD (***) entspricht der schweren Kette des Antikörpers, der zur Präzipitation verwendet wurde.

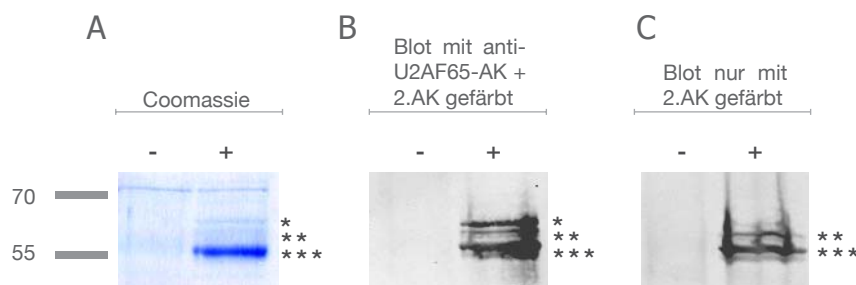
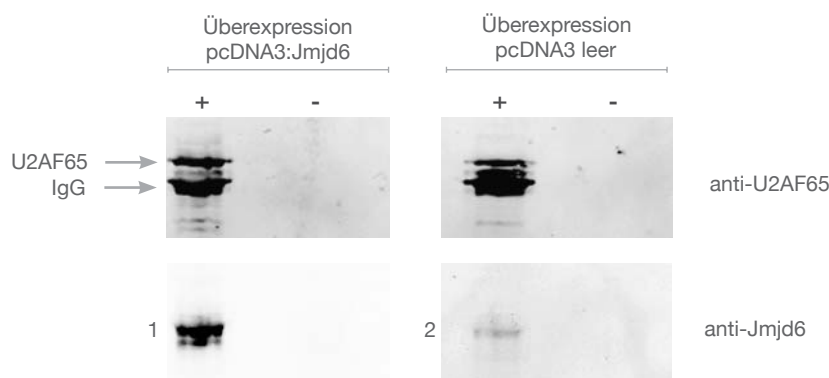


Abb. 22 | Interaktion von U2AF65 mit überexprimiertem und endogenem Jmjd6: HeLa-Zellen wurden mit pcDNA3-Jmjd6 (links), bzw. mit leerem pcDNA3-Plasmid (rechts) transient transfiziert. Die HeLa-Zellysate wurden anschließend mit monoklonalem anti-U2AF65 Antikörper inkubiert (+). Kontrolllysate wurden ohne Antikörper inkubiert (-). Nach Immunpräzipitation wurde im Western Blot mit einem anti-Jmjd6 Antikörper (ab10526, Abcam) getestet, ob Jmjd6 kopräzipitiert werden konnte. 1 = kopräzipitiertes, überexprimiertes Jmjd6; 2 = kopräzipitiertes, endogenes Jmjd6.



2.3 JMJD6-OLIGOMERISIERUNG UND INTERAKTION MIT U2AF65

Im Folgenden wurden die molekularen Erfordernisse für die Interaktion von Jmjd6 und U2AF65 näher analysiert. Dabei wurde auch die Homooligomerisierung von Jmjd6 in Betracht gezogen. Nach Aufreinigung des Jmjd6-Fusionsproteins im "TAP-tag Assay" hatte sich gezeigt, dass Jmjd6 scheinbar stabile Oligomere bildet. Neben der Monomerbande (ca. 60 kD) konnten im Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung auch Banden bei etwa 120 kD und über 170 kD eindeutig als Jmjd6 identifiziert werden (siehe 2.2.1 & Abb. 16). Die Frage, ob diese Komplexe auch vom endogenen Jmjd6 gebildet werden, konnte mit Hilfe einer Immunpräzipitation beantwortet werden.

2.3.1 OLIGOMERISIERUNG DES ENDOGENEN JMJD6

Mit dem polyklonalen anti-Jmjd6 Antikörper ab10526 wurde aus untransfizierten HeLa-Zellen endogenes Jmjd6 präzipitiert. Im Western Blot mit anti-Jmjd6 Antikörpern ergab sich für das endogene Jmjd6 ein nahezu identisches Bandenmuster zum "TAP-tag" Versuch, eine Doppelbande bei ca. 55 kD, was der Größe des Monomers entspricht, eine Bande die in etwa dem Dimer entsprechen könnte (110-120 kD) und eine weitere Doppelbande oberhalb von 170 kD (siehe Abb. 23). Auch endogenes Jmjd6 scheint also stabile Oligomere zu bilden.

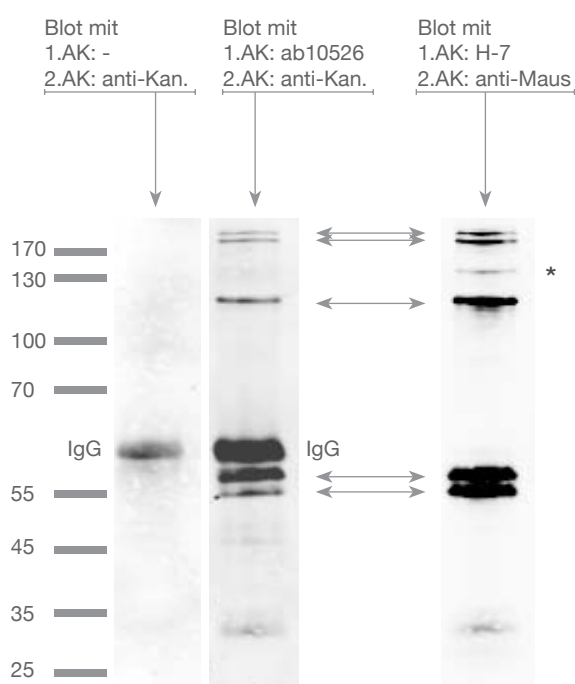


Abb. 23 | Immunpräzipitation des endogenen Jmjd6:

Immunpräzipitation von Jmjd6 (endogen) aus HeLa Zellen mit dem anti-Jmjd6 Antikörper ab10526 (Abcam). Präzipitate aufgetragen auf 4-12% Gradienten NuPage Gel (Invitrogen). Western Blot inkubiert mit entweder ab10526 oder anti-Jmjd6 Antikörper H-7 (santa cruz). Es ergaben sich mit beiden Antikörpern fünf spezifische Banden (Pfeile bei ca. 55 kD, 57 kD, 110 kD, >170 kD, >170 kD). Ab10526 detektierte im Blot noch die schwere Kette des Immunglobulins (IgG) des Präzipitations-AK (Kanninchen-AK). Ab10526 stammt aus Kaninchen, H-7 aus Maus. Bei H-7 gibt es eine zusätzliche Bande (ca. 130 kD, *).

2.3.2 EXPRESSION VON JMJD6-MUTANTEN ALS GFP-FUSIONPROTEINE

Das Jmjd6-Protein ist geprägt von der Jumonji-Domäne, die mehr als ein Drittel der Gesamtsequenz einnimmt. Zusätzlich wurden im humanen Jmjd6 fünf Kernlokalisierungssignale (NLS), ein mögliches Kernexportsignal (NES), ein potentiell DNA-Bindemotiv ("AT-hook"), eine serinreiche Sequenz mit unbekannter Funktion und eine Sumoylierungs-Konsensussequenz identifiziert (siehe 1.4). Um die Jmjd6-Sequenzabschnitte zu identifizieren, die für die Oligomerisierung und die Bindung an U2AF65 essentiell sind, wurden verschiedene N- und C-terminale Deletionsmutanten, Mutanten mit verändertem Fe(II)-Bindemotiv oder mutiertem "AT-hook" generiert und in den Vektor pEGFP-N1 kloniert. Eine Übersicht der verwendeten Jmjd6-Mutanten liefert die Abb. 24.

Zuerst wurde die Expression der mutierten Jmjd6-GFP-Fusionsproteine in HeLa und HEK 293T Zellen getestet. Dabei zeigte sich, dass alle Varianten ausschließlich im Kern lokalisiert sind. Transient überexprimiertes Jmjd6-GFP ("full-length") war im Interchromatinraum des Nukleoplasmas stark exprimiert, die Nukleoli waren größtenteils ausgespart und nur bestimmte Bereiche des Nukleolus zeigten starke Färbung. Mit zunehmender N-terminaler Deletion schien die Verteilung im Kern (von $\Delta 1-4$ bis $\Delta 1-131$) diffuser und weniger charakteristisch zu werden (siehe Abb. 25). Die C-terminalen Mutanten $\Delta 380-403$ und $\Delta 363-403$ zeigten ein normales Verteilungsmuster im Kern. Dagegen war bei der $\Delta 338-403$ -Mutante eine dramatische Veränderung zu beobachten. Dieser Mutante fehlt im Gegensatz zu $\Delta 363-403$ der serinreiche Sequenzabschnitt am C-Terminus. Dies führte dazu, dass das Protein nahezu komplett in den Nukleoli akkumulierte (siehe Abb. 26). Die $\Delta 338-403$ -Mutante wird unter 2.6.1 detaillierter untersucht.

Jmjd6 hat ein potentiell Fe(II)-Bindemotiv der allgemeinen Form His-X-Asp/Glu...His., welches ein gut konserviertes Charakteristikum aller nicht-Häm Fe(II)-abhängigen Oxygenasen ist (siehe 1.5). Die Mutation des ersten Histidins bzw. des zweiten Aspartats zu Alanin in z.B. dem strukturell verwandten FIH führt dazu, dass das Protein in vivo inaktiv ist. Man stellt sich vor, dass Fe(II) nicht komplexiert werden kann, dadurch das aktive Zentrum gestört und die enzymatische Aktivität unterbunden ist (Lando D et al, 2002). In den Jmjd6 Mutanten ASM1 ("active-site-mutation 1") und ASM2 ("active-site-mutation 2") sind H187 bzw. H187 und D189 des Fe(II) Bindemotivs zu Alanin mutiert worden, so dass auch hier eine potentielle enzymatische Aktivität gestört sein könnte. Die Überexpression der GFP-Fusionen zeigte keine sichtbaren Auffälligkeiten. Erst bei gleichzeitiger De-

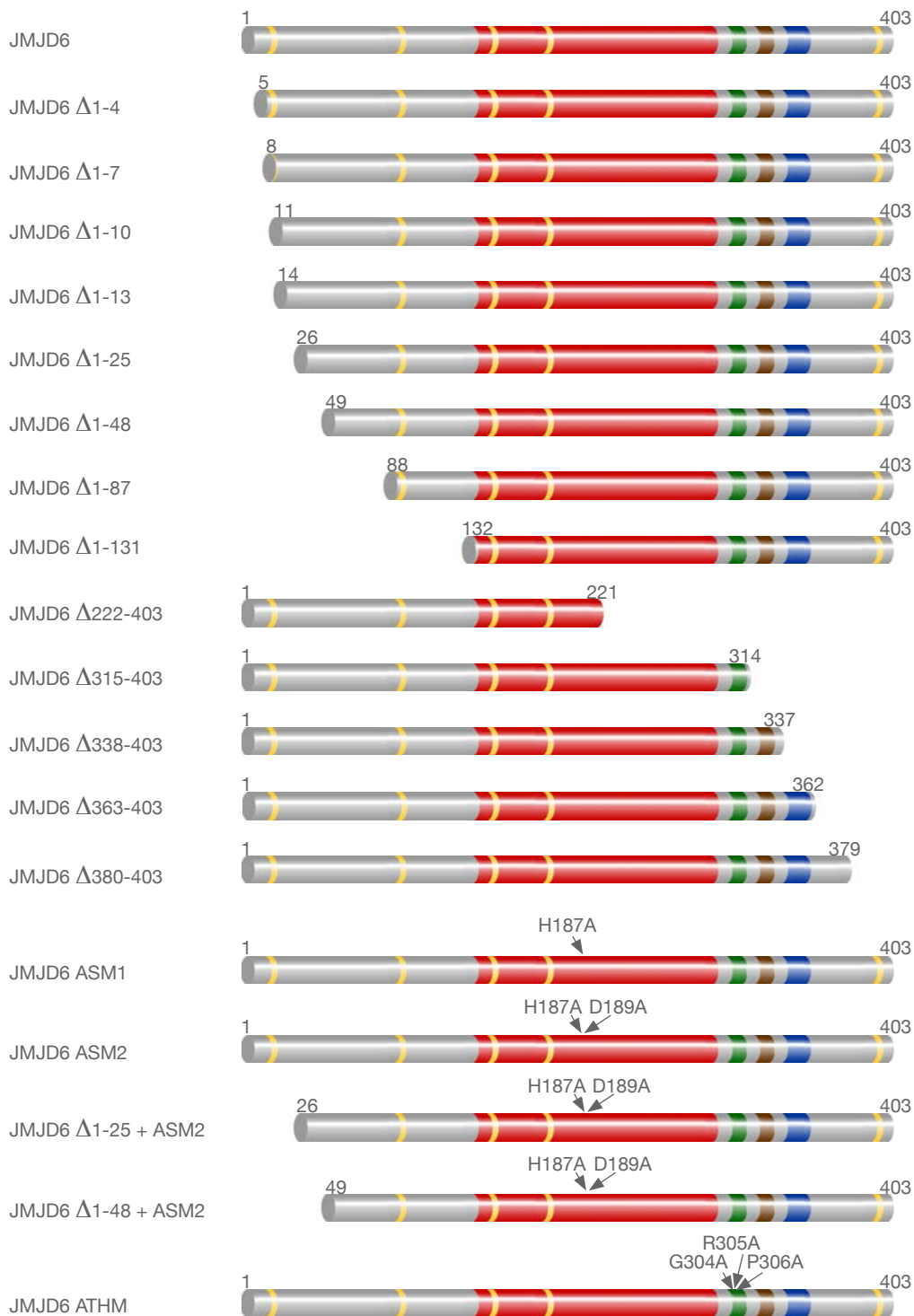
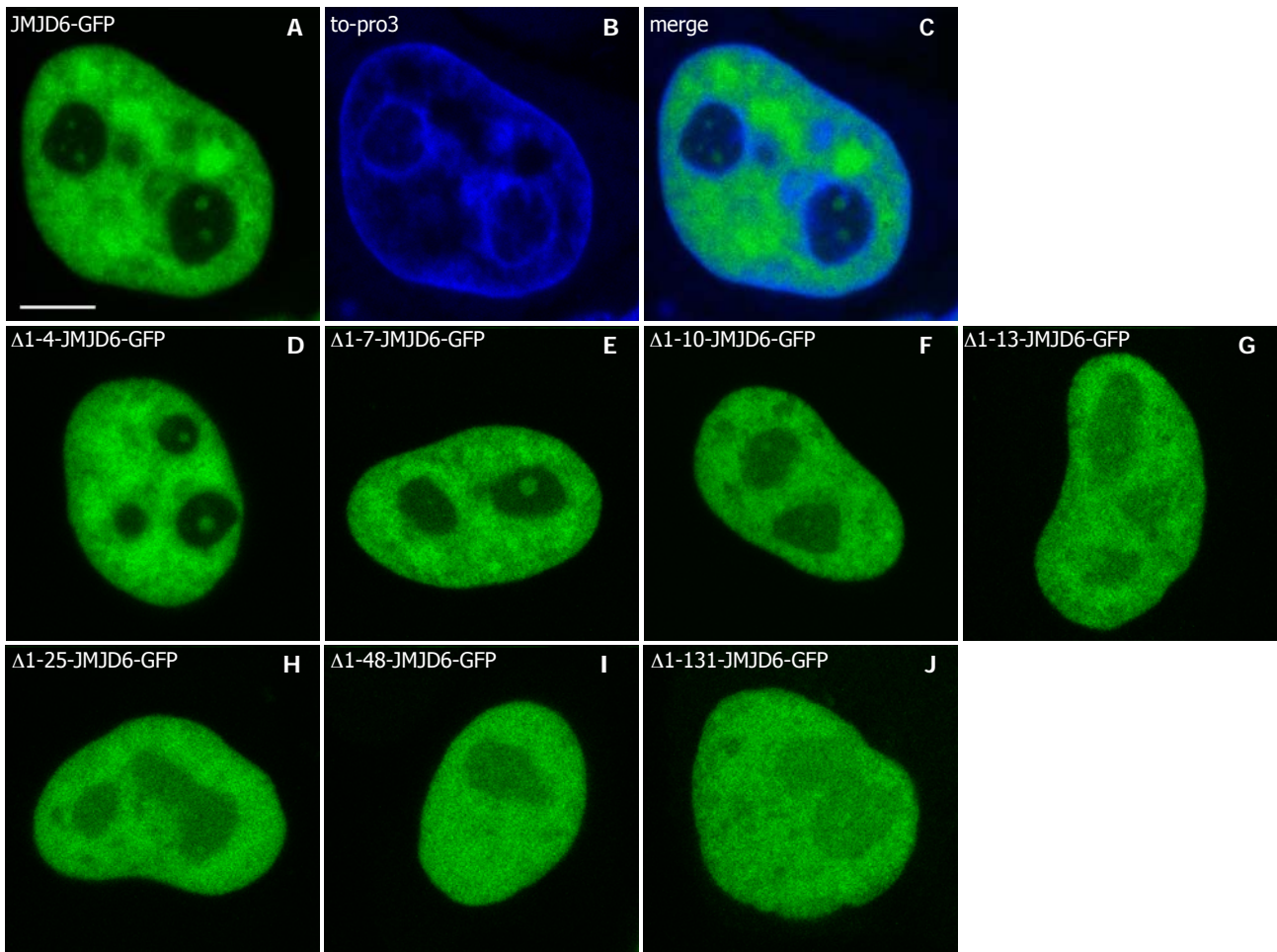


Abb. 24 | Schematische Darstellung aller Jmjd6-Mutanten:
Es wurden verschiedene N- und C-terminale Jmjd6-Deletionsmutanten generiert. Bei der ATHM-Mutante wurde das essentielle "AT-hook"-Motiv GRP des potentiellen "AT-hooks" in Jmjd6 zu AAA mutiert. Die potentiellen Fe(II)-bindenden Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in den ASM-Mutanten mutiert. Bei ASM1 H187A, bei ASM2 H187A und D189A.

letion des N-Terminus wiederholte sich das diffuse Muster der reinen N-terminalen Mutanten (siehe Abb. 27). Die Mutation der essentiellen Aminosäuren GRP des potentiellen "AT-hooks" zu AAA hatte ebenfalls keinen sichtbaren Einfluss auf die Verteilung des GFP-Fusionsproteins im Zellkern (siehe Abb. 28).

Abb. 25 | N-terminale Jmjd6-Deletionsmutanten in HeLa Zellen: Überexpression der GFP-Fusionsproteine (pEGFP-N1) von Jmjd6 (A-C) und verschiedenen N-terminalen Jmjd6-Deletionsmutanten (D-J) in HeLa-Zellen. DNA-Färbung mit to-pro3. Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m



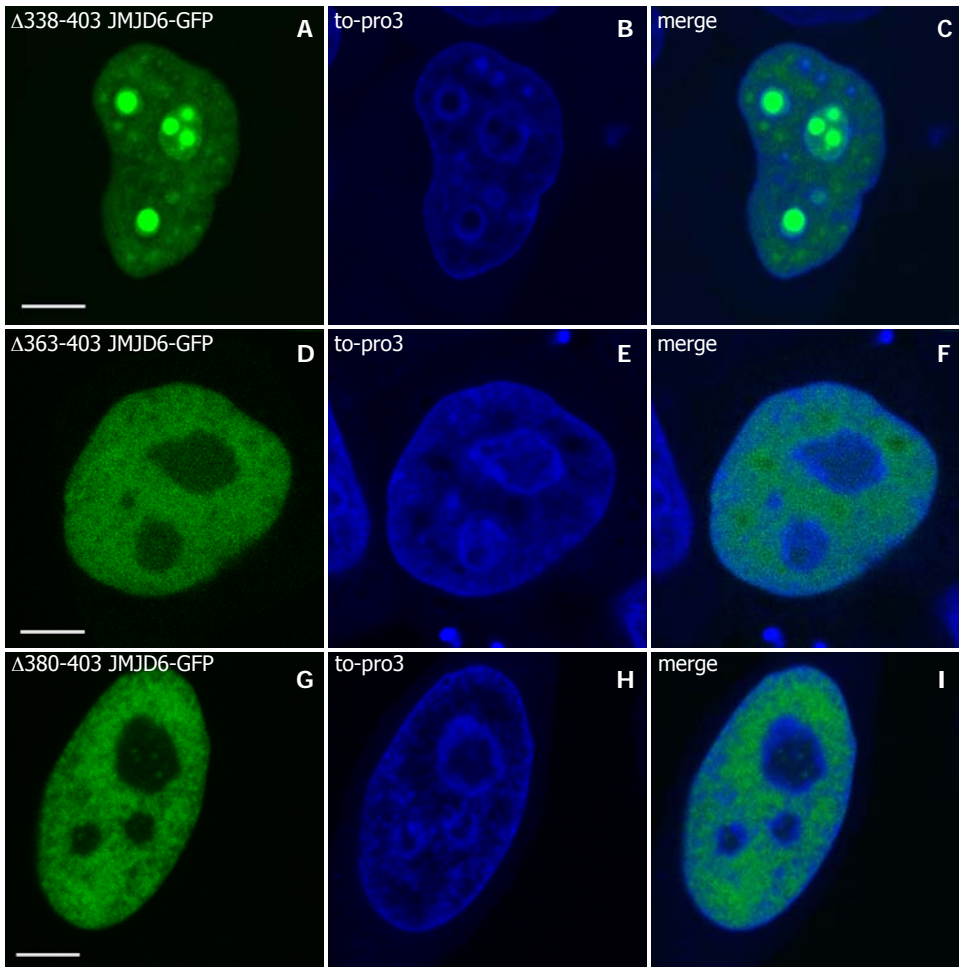


Abb. 26 | C-terminale Jmjd6-Mutanten in HeLa Zellen: Überexpression der GFP-Fusionsproteine (pEGFP-N1) der C-terminalen Jmjd6-Mutanten $\Delta 338-403$ (A-C), $\Delta 363-403$ (D-F) und $\Delta 380-403$ (G-I) in HeLa-Zellen. $\Delta 338-403$ (A-C) zeigt eine ungewöhnlich starke Akkumulation der überexprimierten Mutante in den Nukleoli. DNA-Färbung mit to-pro3. Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μm (A-J)

Abb. 27 | "Active-site" Jmjd6-Mutanten (ASM1, ASM2) in HeLa Zellen: Mutationen des potentiellen Jmjd6 Fe(II)-Bindemotivs. ASM1 entspricht der Mutation H187A (A). ASM2 trägt zusätzlich noch die Mutation D189A (B). In Kombination mit verschiedenen N-terminalen Mutanten (C, D). Alle als GFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen überexprimiert. Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μm (A-D)

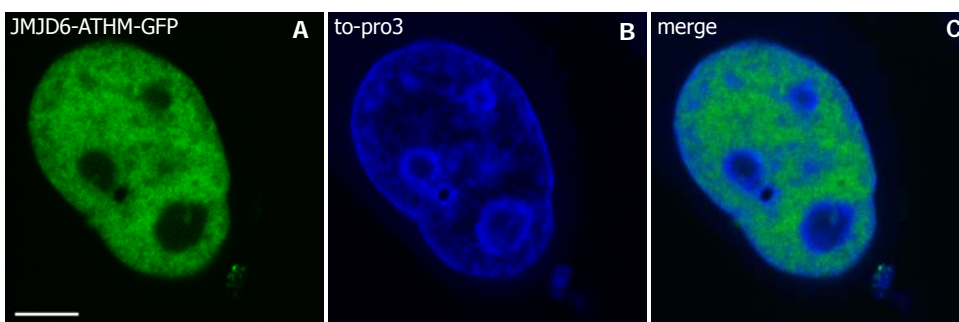
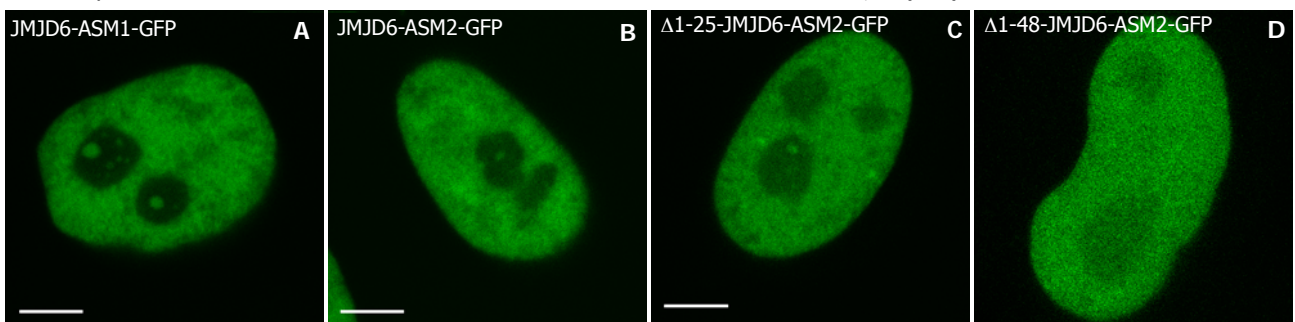


Abb. 28 | ATHM-Jmjd6-Mutante in HeLa Zellen: Mutation des potentiellen JMJD6 "AT-hook" Motivs. GFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen überexprimiert. DNA-Färbung mit to-pro3. Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μm

2.3.3 JMJD6-INTERAKTIONSTESTS IM F2H-ASSAY

Im "fluorescent two-hybrid-Assay" (F2H-Assay; Zolghadr K et al, 2008) lässt sich die Interaktion zweier transient überexprimierter Proteine in vivo testen. Hierfür wurde Jmjd6 ("full-length") in den pF2H-bait Expressionsvektor kloniert. Dadurch entstand ein Fusionsprotein aus Jmjd6, rot-fluoreszierendem Protein und einer Lac-Repressor-Domäne (LacI). Dieses Fusionsprotein wurde in transgenen BHK-Zellen ("baby hamster kidney") überexprimiert, welche eine Sequenz aus ca. 250 Kopien des Lac-Operators ins Genom integriert haben (Tsukamoto T et al, 2000). Die Interaktion zwischen LacI und Lac-Operator-Sequenz ließ das überexprimierte Protein an einem definiertem Punkt im Zellkern akkumulieren. Erkennbar war dieser durch die rote Fluoreszenz. Jmjd6 ("full-length") und verschiedene Jmjd6-Mutanten wurden nun als GFP-Fusionsproteine in den BHK-Zellen koexprimiert. Wenn es eine Interaktion zwischen den verschiedenen Jmjd6-Proteinen gibt, dann sammelt sich die GFP-Variante am selben Punkt. Der Test zweier Wildtyp-Jmjd6-Konstrukte im F2H-Assay zeigte eine eindeutige Interaktion der beiden Jmjd6-Proteine, was die Annahme einer Homooligomerisierung bestätigt (siehe Abb. 29). Auch die N-terminalen Deletionsmutanten $\Delta 1-4$ bis $\Delta 1-25$ können noch mit Wildtyp-Jmjd6 interagieren, dagegen ist bei $\Delta 1-48$ die Interaktion unterbunden (siehe Abb. 30). Eine Veränderung der Fe(II) koordinierenden Aminosäuren oder des potentiellen "AT-hooks" (ASM1, ASM2, ATHM) hatten keinen Einfluss auf die Interaktion. Erst die Doppelmutante aus ASM2 und $\Delta 1-48$ verliert wieder die Interaktionsfähigkeit mit Wildtyp-Jmjd6 (siehe Abb. 31). Die C-terminale Deletionsmutante $\Delta 363-403$ ist nicht beeinflusst. Selbst bei der größtenteils im Nukleolus akkumulierenden Jmjd6-Mutante $\Delta 338-403$ ist im Nukleoplasma noch Interaktion zu erkennen (siehe Abb. 32). Somit scheint der N-terminale Abschnitt der Aminosäuren 25-48 der entscheidende Sequenzabschnitt für die Homooligomerisierung des Jmjd6 Proteins zu sein.

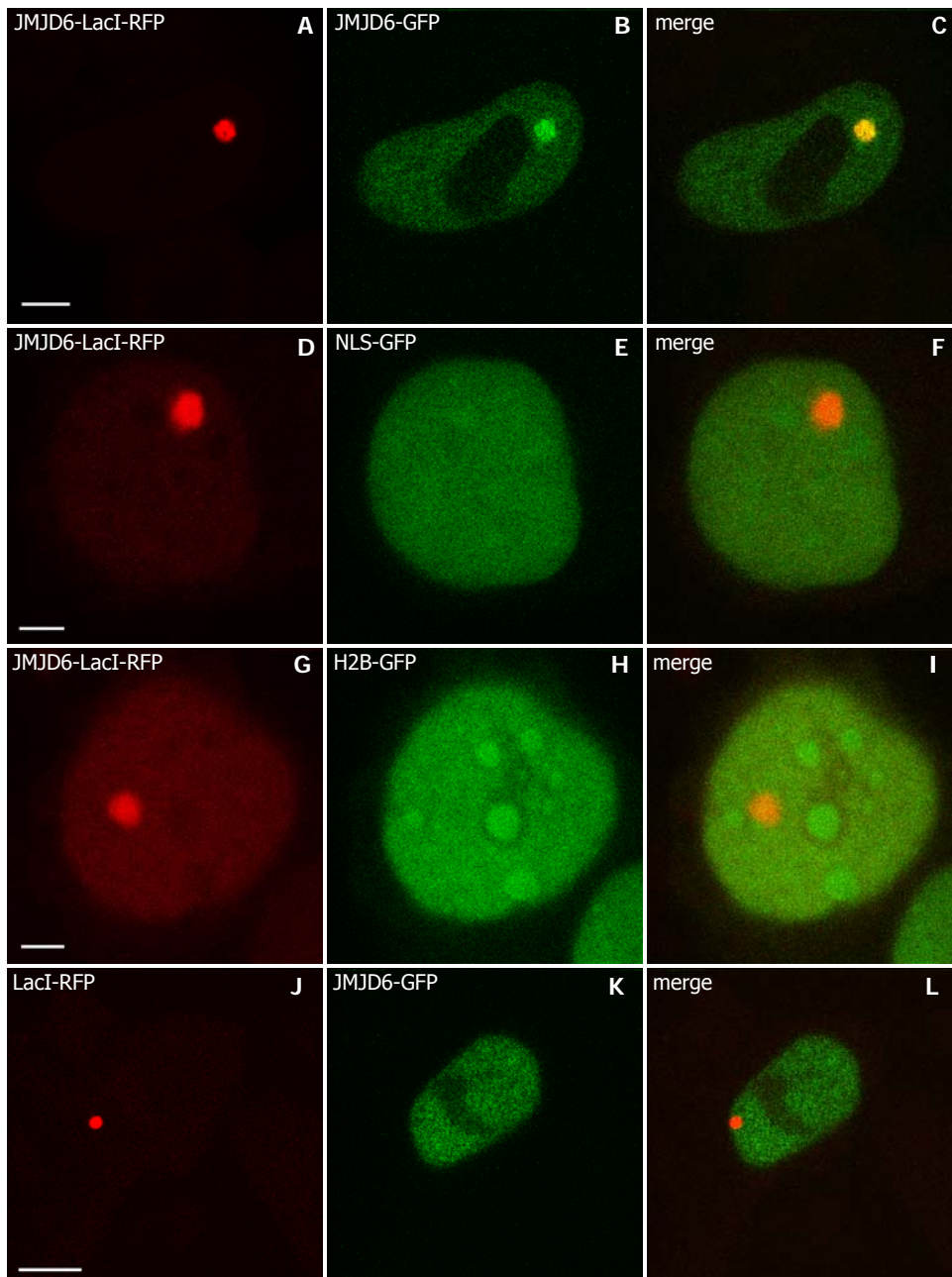


Abb. 29 | Jmjd6 im "Fluorescent-two-Hybrid-Assay": Jmjd6-LacI-RFP Vektor kann im F2H-Assay mit Jmjd6-GFP interagieren (A-C). NLS-GFP (D-F) und Histon2B-GFP (G-I) als Kontrollen interagieren nicht mit Jmjd6-LacI-RFP. Leerer pF2H-bait Vektor führt zur Konzentration von LacI-RFP an den im Genom integrierten Lac-Operator-Sequenzen (J). Jmjd6-GFP wird in diesem Fall nicht an diese rekrutiert (K, L). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

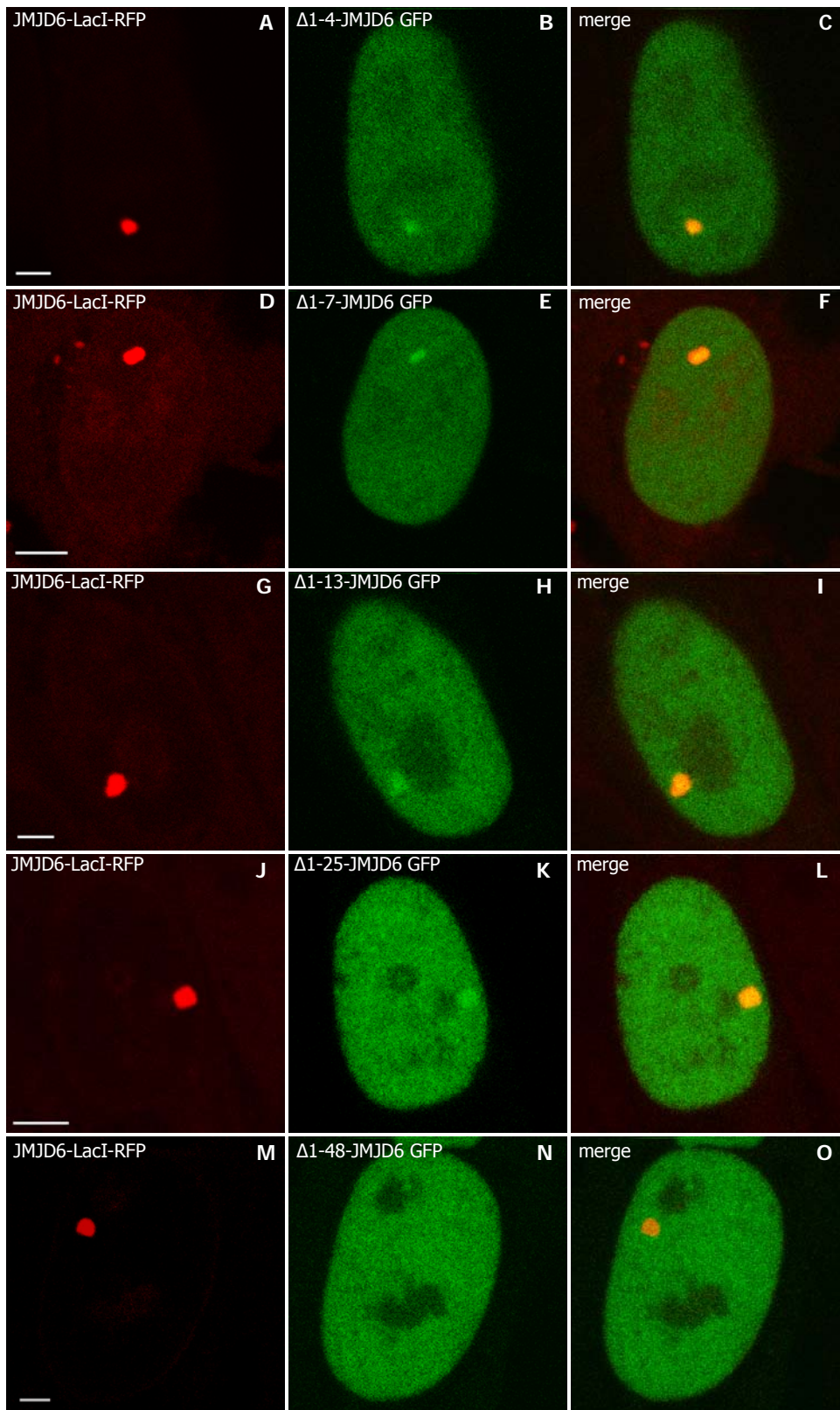


Abb. 30 | F2H-Assay mit N-terminalen Jmjd6 Deletionsmutanten: Exprimiert man verschiedene N-terminale Jmjd6 Deletionsmutanten als GFP-Fusionsproteine, so sind sie bis $\Delta 1-25$ noch in der Lage mit Jmjd6-LacI-RFP im F2H-Assay zu interagieren (A-L). Deletiert man aber die ersten 48 Aminosäuren ($\Delta 1-48$) so ist keine Interaktion mit Jmjd6-LacI-RFP mehr zu sehen (M-O). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μm

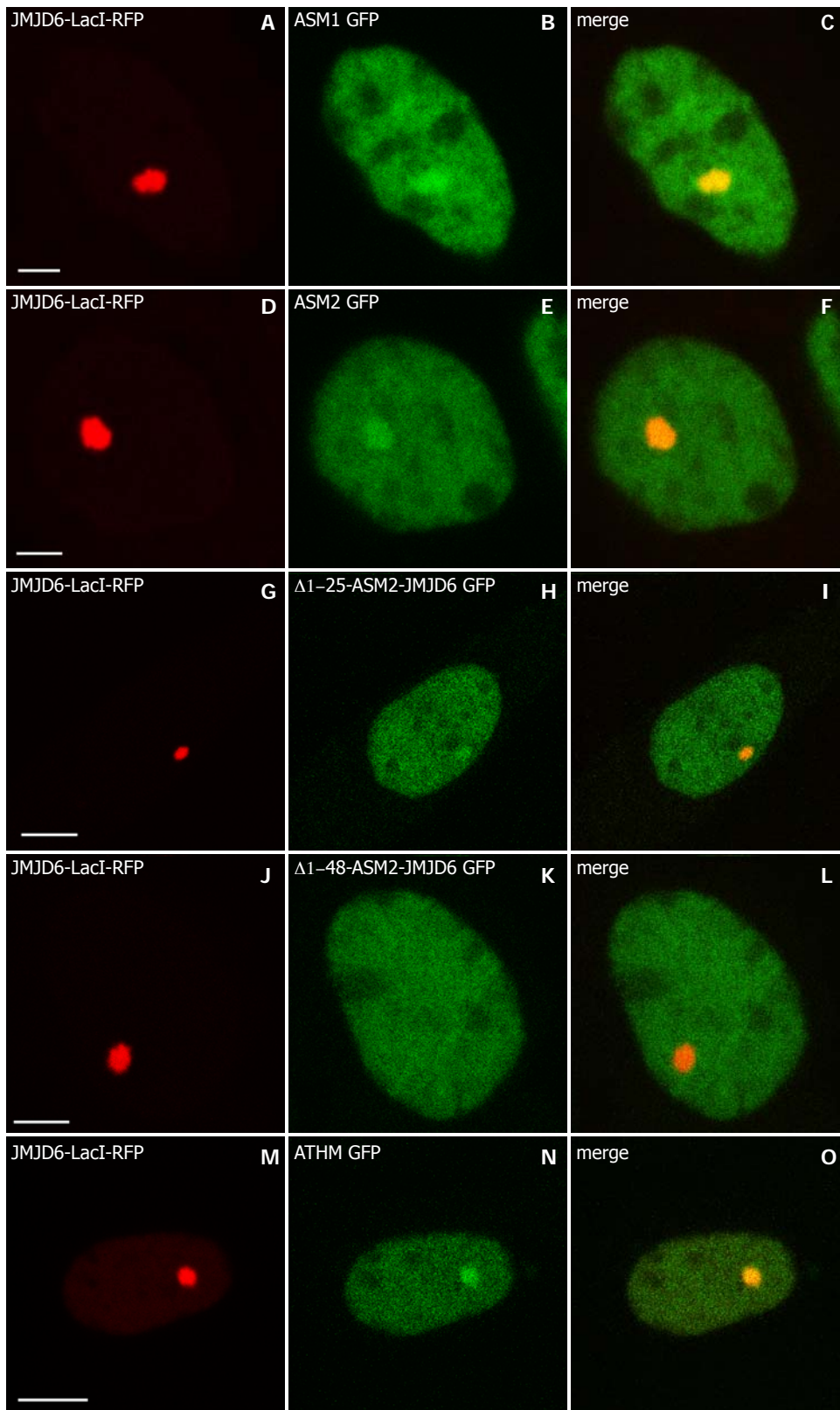


Abb. 31 | F2H-Assay mit "Active-Site" Jmjd6 Mutanten und "AT-hook" Mutante: Interaktion von Jmjd6-LacI-RFP mit ASM1-GFP (A-C), ASM2-GFP (D-F) und $\Delta 1-25$ -ASM2-GFP (G-I) erkennbar. Erst die Doppelmutante $\Delta 1-48$ -ASM2-GFP zeigt keine Interaktion mit Jmjd6-LacI-RFP mehr (J-L). Durch die Mutation des potentiellen "AT-hooks" ist die Interaktion nicht gestört (M-O). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

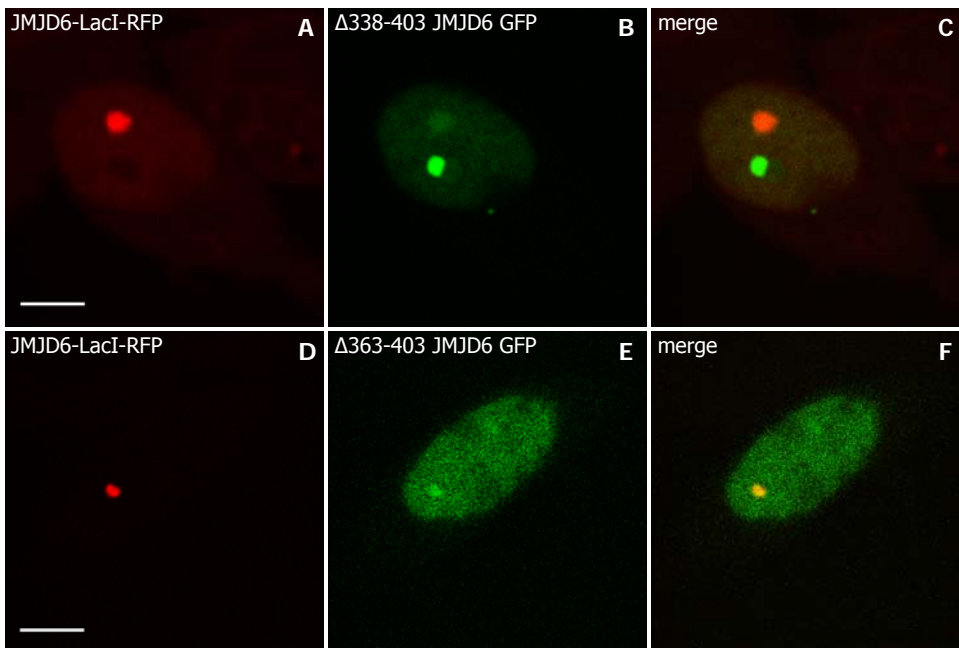


Abb. 32 | F2H-Assay mit C-terminalen Jmjd6 Deletionsmutanten: Exprimiert man $\Delta 338-403$ -Jmjd6 (A-C) und $\Delta 363-403$ -Jmjd6 (D-F) als GFP-Fusionsproteine ist in beiden Fällen die Interaktion mit Jmjd6-LacI-RFP im F2H-Assay möglich. Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

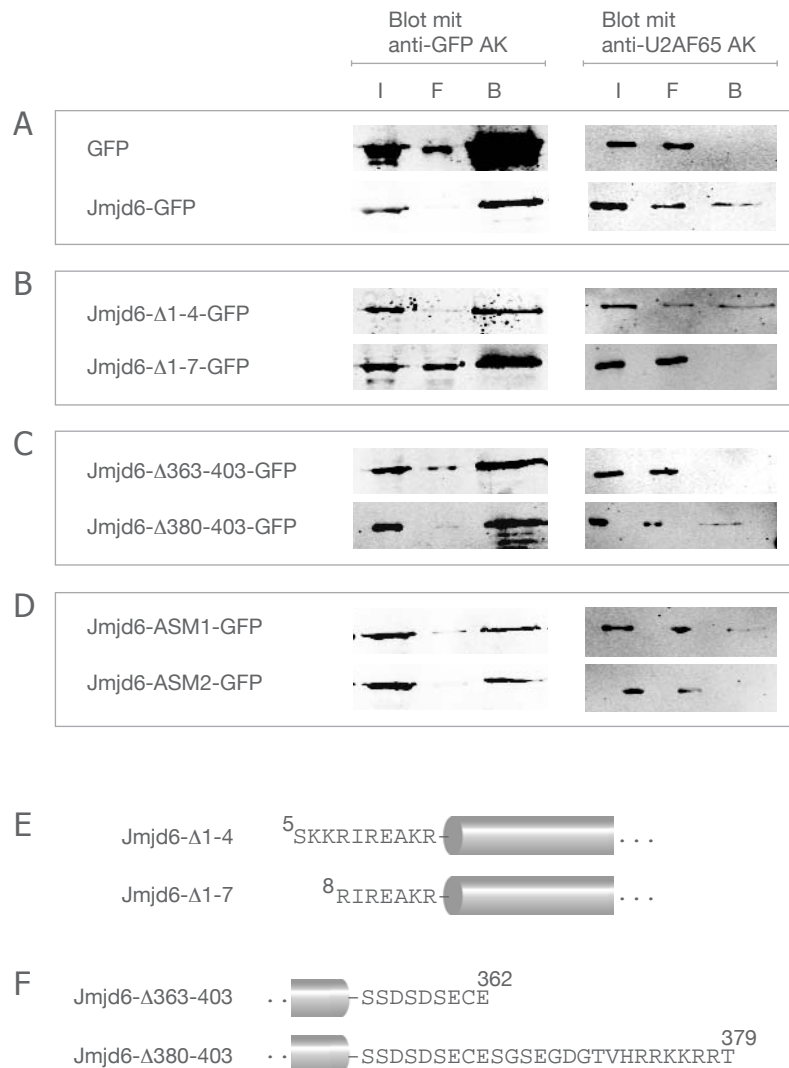
2.3.4 CHARAKTERISIERUNG DER U2AF65 BINDESTELLE IM JMJD6

Die spezifische Bindung zwischen dem SR-Protein U2AF65 und Jmjd6 konnte in drei unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden ("TAP-tag", "GFP-Pulldown", Immunpräzipitation; siehe 2.2.1 & 2.2.3). Um die Interaktion genauer charakterisieren zu können, wurden verschiedene Jmjd6-Mutanten auf ihre Fähigkeit, mit U2AF65 zu interagieren, untersucht. Die Interaktion der transient überexprimierten Jmjd6-Mutanten mit endogenem U2AF65 wurde mit Hilfe des "GFP-Pulldown-Assays" (Rothbauer U et al, 2008) in HEK 293T Zellen getestet. Es zeigte sich, dass bereits eine Deletion der ersten sieben Aminosäuren ($\Delta 1-7$ Jmjd6) ausreichte, um die Interaktion zu verhindern (siehe Abb. 32 B). Aber auch die C-terminale Deletionsmutante $\Delta 363-403$ Jmjd6 war nicht mehr in der Lage, U2AF65 zu binden, wohingegen $\Delta 380-403$ Jmjd6 wieder interagieren konnte (siehe Abb. 33 C).

Die korrekte Bildung des potentiellen aktiven Zentrums ist für die U2AF65-Bindung von Bedeutung. Die ASM1-Jmjd6 Mutante band noch schwach, ASM2-Jmjd6 überhaupt nicht mehr an U2AF65 (siehe Abb. 33 D). In beiden Fällen sind Aminosäurereste der Fe(II) Bindestelle des aktiven Zentrums mutiert (H187A bzw. H187A + D189A).

Abb. 33 | Interaktion Jmjd6 und U2AF65: Jmjd6 und verschiedene Deletionsmutanten wurden als GFP-Fusionsproteine in HEK 293T-Zellen überexprimiert und nach "GFP-Pulldown" auf Interaktion mit U2AF65 getestet. Western Blot mit α -GFP Antikörper, um Jmjd6-"Pulldown" nachzuweisen (links) und mit α -U2AF65 Antikörper um Ko-Präzipitation von U2AF65 zu zeigen (rechts). Eine Deletion der ersten sieben Aminosäuren des Jmjd6 reicht aus, um die Interaktion zu unterbinden (B). Aber auch der C-Terminus scheint von Bedeutung, da auch Jmjd6 Δ 363-403 nicht mehr in der Lage ist mit U2AF65 zu interagieren (C). Bei der Jmjd6-ASM1 Mutante scheint die Interaktion schwächer, wohingegen ASM2 keine Interaktion mehr zeigt (D). Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzunterschiede zwischen Δ 1-4 und Δ 1-7 (E) und Δ 363-403 und Δ 380-403 (F).

I = Input-Fraktion (2% des Gesamtproteingehalts), F = Durchfluss-Fraktion (2% des Gesamtproteingehalts), B = Beads-Fraktion (10% des Gesamtproteingehalts).



Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion von Jmjd6 und U2AF65 den N-Terminus und einen intakten C-Terminus benötigt. Der N-Terminus ist auch für die Oligomerisierung erforderlich, die kritischen Aminosäuren liegen allerdings nicht ganz N-terminal, sondern zwischen den Aminosäuren 25 und 48.

2.4 JMJD6 HAT LYSIN-5-HYDROXYLASEAKTIVITÄT

U2AF65 hat ebenso eine RS- (Arginin-Serin) Domäne, wie knapp ein Drittel der potentiellen Jmjd6 Interaktionspartner aus dem "TAP-tag" Experiment. Die Domäne ist charakteristisch für die SR-Proteinfamilie, deren Mitglieder im Spleißprozess eine wichtige Rolle spielen (Long & Caceres, 2009).

Die Methylierung von Argininen in der RS-Domäne beeinflusst dabei die Funktionalität der Proteine und dadurch konstitutives oder alternatives Spleißen (Pahlich S et al, 2006; Cheng D et al, 2007). Chang B et al charakterisierten Jmjd6 als Histon-Arginin-Demethylase (siehe 1.5.3; Chang B et al, 2007). Eine mögliche Demethylaseaktivität von Jmjd6 sollte deshalb an methylierten RS-Peptiden kontrolliert werden.

2.4.1 LYSIN-HYDROXYLIERUNG AN PEPTIDEN UND REKOMBINATEM U2AF65

Das Labor von Prof. Christopher Schofield (Chemistry Research Laboratory, Oxford University) generierte Peptide, basierend auf den RS-Domänen von humanem U2AF65, Luc7A und Luc7B2 mit dimethylierten Argininresten. Nach Inkubation mit rekombinantem Jmjd6, Fe(II), 2-Oxoglutarat, Sauerstoff und Ascorbat wurde aber keine Demethylierung beobachtet. Stattdessen konnte eine Hydroxylierung von Lysinresten massenspektrometrisch detektiert werden (siehe Abb. 34 A). Diese Hydroxy-Lysine wurden nach Zugabe des Fe(II)-2-OG-Oxygenasen Inhibitors N-Oxalylglycin (NOG), bzw. bei Mutation der potentiellen Fe(II) bindenden Aminosäuren H187 und D189 im Jmjd6 nicht gefunden. Mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR Spektroskopie) konnte gezeigt werden, dass die Hydroxylierung am C5-Atom des Lysins stattfindet (siehe Abb. 34 B; Webby CJ et al, 2009).

Inkubierte man rekombinantes humanes U2AF65 ("full length") mit rekombinantem humanem Jmjd6 ("full length") unter o.g. Bedingungen, so wurde das Lysin an Position K276 im U2AF65 hydroxyliert. Im gleichen Ansatz ohne Jmjd6 fand keine Hydroxylierung statt (Webby CJ et al, 2009).

2.4.2 ENDOGENES U2AF65 WIRD VON JMJD6 AN LYSIN HYDROXYLIERT

Die Hydroxylierung von Lysin als posttranslationale Modifikation ist bei intrazellulären Proteinen bisher unbekannt. Einzig beim Kollagen und Proteinen mit Kollagen-ähnlichen Domänen der extrazellulären Matrix ist Hydroxy-Lysin beschrieben. Die Hydroxylgruppe am Lysin hat im Falle des Kollagens entscheidende Bedeutung für die intra- und intermolekulare Strukturstabilität. Ausserdem dient sie als Basis für spezifische Glykosylierungen. Verantwortlich für die Hydroxylierung ist das Enzym Protokollagen-Lysin-2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase (Kivirikko & Pihlajaniemi, 1998).

Um die in-vitro Ergebnisse der K276 Hydroxylierung am rekombinanten U2AF65 zu untermauern,

wurde versucht, diese Modifikation in-vivo am endogenen U2AF65 nachzuweisen. Hierfür wurde aus HeLa Zellen das endogene U2AF65 mit Hilfe eines monoklonalen anti-U2AF65 Antikörpers immunpräzipitiert, mit LysC-Protease verdaut und anschließend im Massenspektrometer (LC-MS/MS) analysiert. Es konnten hierbei auch im endogenen U2AF65 hydroxylierte Peptide identifiziert werden. Durch die Fragmentierung der Peptide (MS/MS) war es möglich, die Hydroxylierung eindeutig dem Lysin K276 zu zuordnen (siehe Abb. 35), welches mit einer Häufigkeit von 1:250 (modifiziert : unmodifiziert) hydroxyliert war. Zusätzlich wurde auch eine Hydroxylierung am Lysin K15 festgestellt (siehe Abb. 36), die mit einer Häufigkeit von etwa 1:100 (modifiziert : unmodifiziert) auftrat. Zum Beweis dafür, dass die beobachteten Hydroxylierungen von der Enzymaktivität des Jmjd6 ab-

A



B

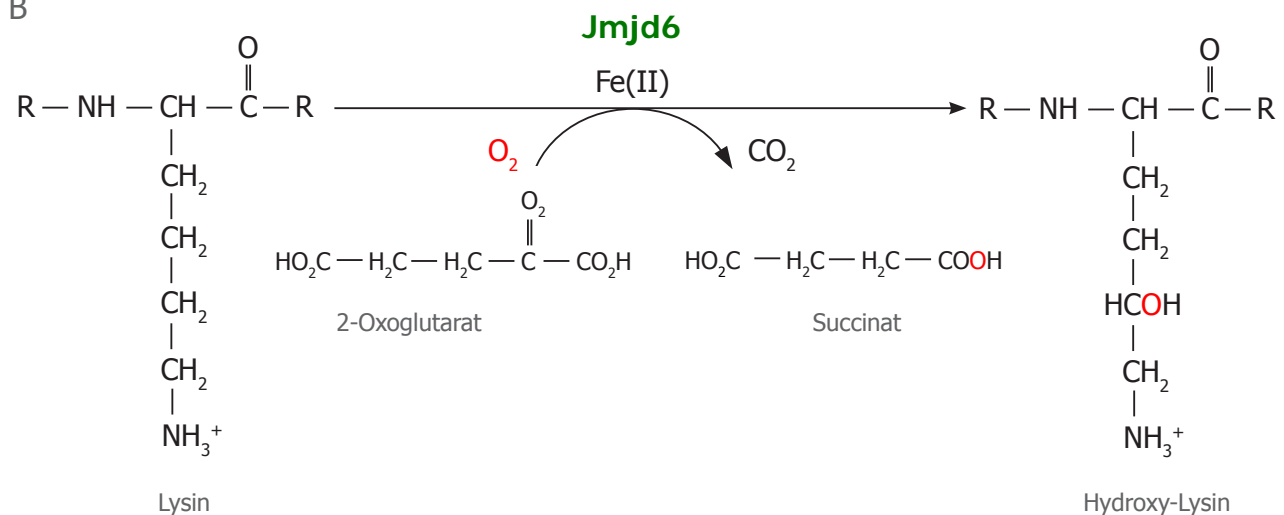
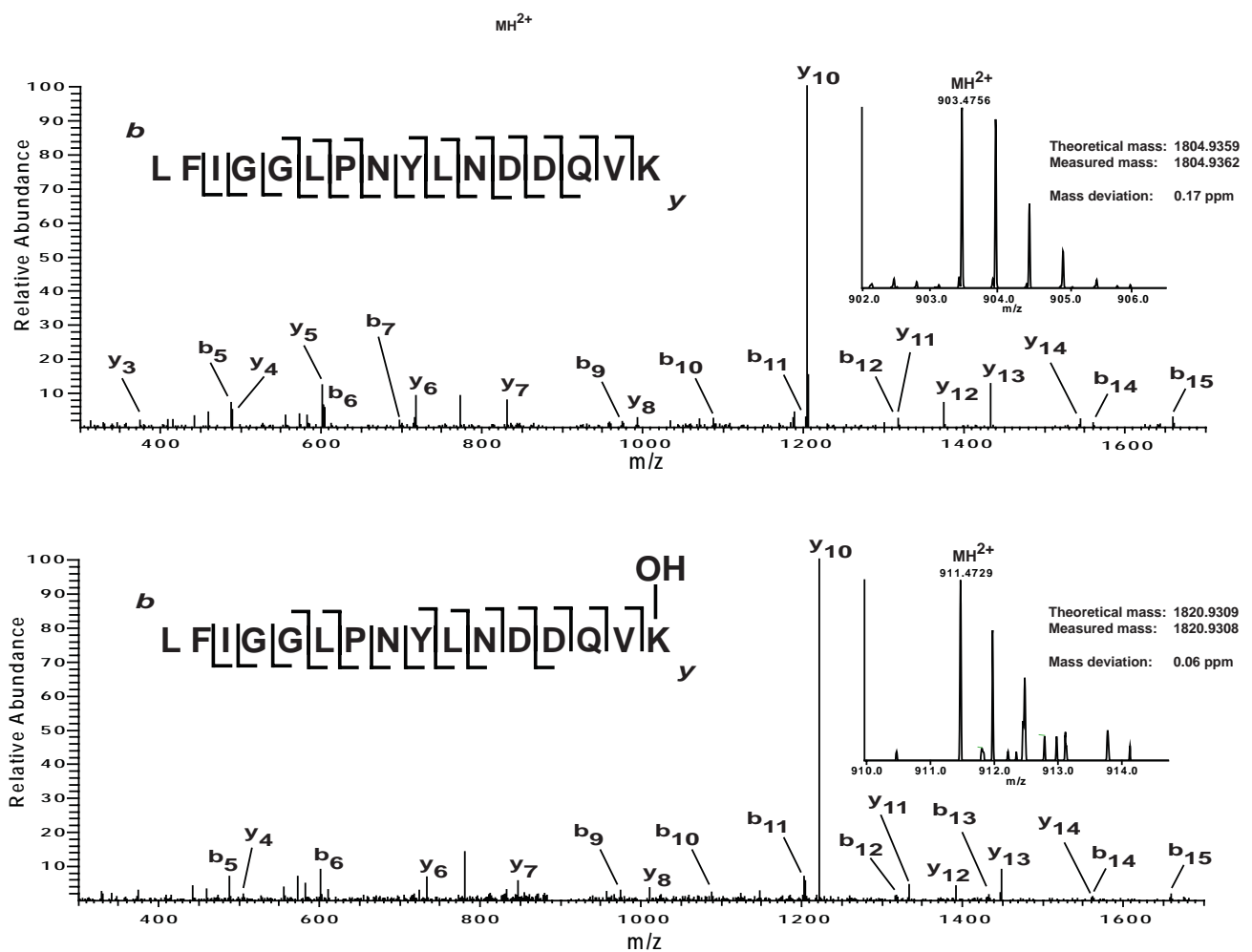


Abb. 34 | Lysin Hydroxylierung durch Jmjd6 in vitro: Peptide basierend auf der RS-Domäne von den Jmjd6-Interaktionspartnern U2AF65 und hLuc7B2 wurden unter Zugabe von rekombinantem Jmjd6, Fe(II), 2-Oxoglutarat, Sauerstoff und Ascorbat an Lysinen hydroxyliert. (A) Zwei Beispielpeptide aus dem Labor von Prof. Christopher Schofield (Oxford) an denen die Hydroxylierung massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. (B) Schematische Darstellung der Hydroxylierungsreaktion am Lysin.

hängen, wurde endogenes U2AF65 aus zwei verschiedenen HeLa-Zellpopulation präzipitiert. In einem Fall wurden die Zellen mit Jmjd6 in pcDNA3-Vektor transient transfiziert. Als Kontrolle wurde im zweiten Fall leerer pcDNA3 Vektor transfiziert. Das Ergebnis zeigte, dass bei Überexpression von Jmjd6 die Häufigkeit der K15 Hydroxylierung um den Faktor fünf (1:20) anstieg im Vergleich zur Kontrolle (1:100) (siehe Abb. 37). Die massenspektrometrischen Analysen wurden im Labor von Matthias Mann (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

Abb. 35 | Lysin276 Hydroxylierung im endogenen U2AF65: Nach Immunpräzipitation des endogenen U2AF65 und anschließendem LysC-Protease Verdau wurden die Proteine massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). Das zur Fragmentierung ausgewählte Peptid mit K276 ist angezeigt. MS-Spektrum der Fragmentierung des unmodifizierten Peptids (oben) und des hydroxylierten Peptids (unten).



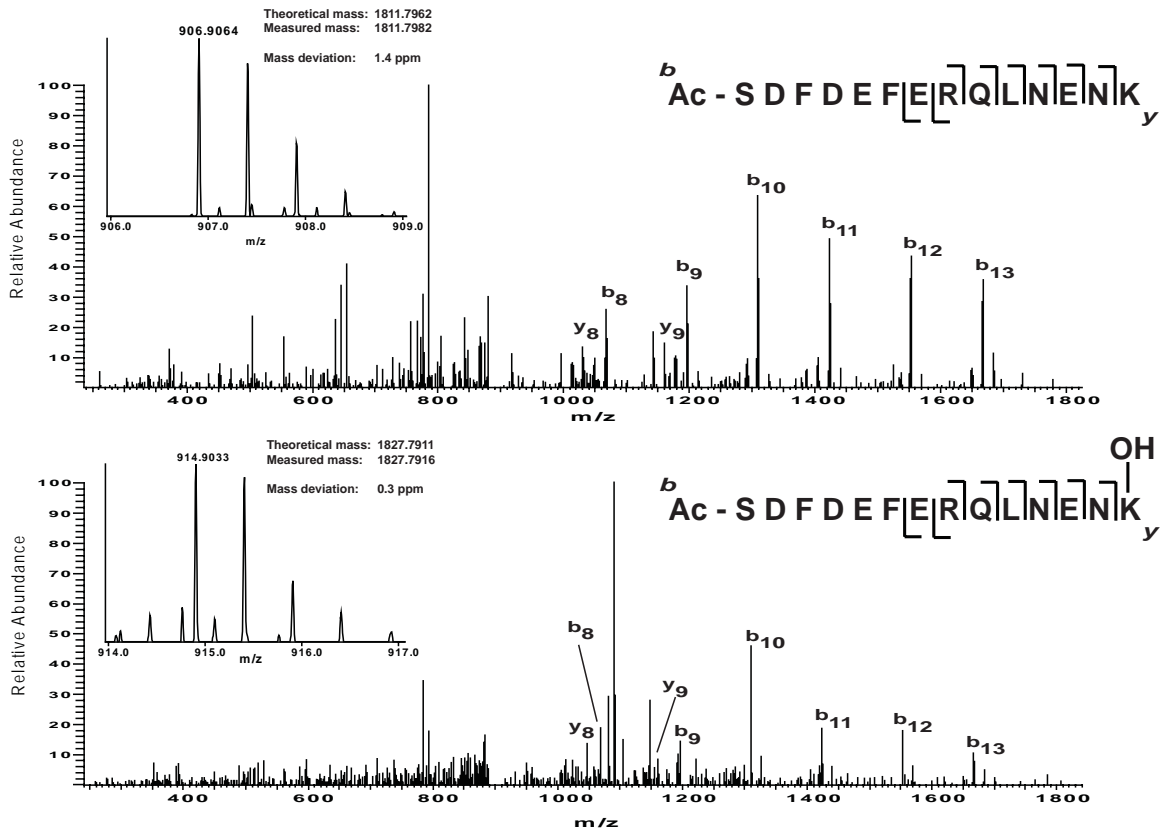


Abb. 36 | Lysin15 Hydroxylierung im endogenen U2AF65: Nach Immunpräzipitation des endogenen U2AF65 und anschließendem LysC-Protease Verdau wurden die Proteine massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). Das zur Fragmentierung ausgewählte Peptid mit K15 ist angezeigt. MS-Spektrum der Fragmentierung des unmodifizierten Peptids (oben) und des hydroxylierten Peptids (unten).

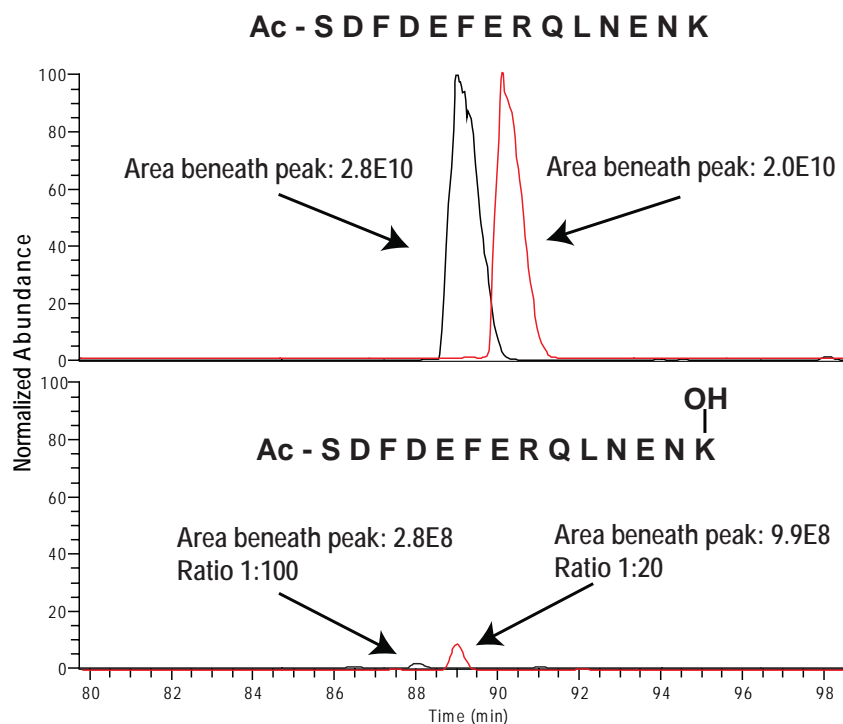


Abb. 37 | Vergleich der K15 Hydroxylierung in endogenem U2AF65 nach Jmjd6 und "mock"-Transfektion: Immunpräzipitation des endogenen U2AF65 aus HeLa-Zellpopulation, die Jmjd6 überexprimiert. Die Kontrollpopulation wurde "mock" transfiziert. Nach LC-MS/MS Analyse des präzipitierten U2AF65 wurde die K15 Hydroxylierung quantifiziert. Das ausgewählte Peptid mit K15 ist angezeigt. Das Chromatogramm oben (XIC, "extracted ion chromatogram") zeigt unmodifiziertes Peptid aus mock-Zellpopulation (schwarze Linie) und Jmjd6-Überexpression (rote Linie). In beiden Populationen ist die K15 Hydroxylierung etwa gleich häufig. Das untere Chromatogramm zeigt hydroxyliertes Peptid aus "mock"-Zellpopulation (schwarze Linie) und Jmjd6-Überexpression (rote Linie). Durch Jmjd6-Überexpression ist die Häufigkeit der K15 Hydroxylierung um den Faktor fünf größer.

2.4.3 JMJD6 AUTO-HYDROXYLIERUNG

Neben der Hydroxylierung von rekombinantem U2AF65 war rekombinantes Jmjd6 bei Inkubation mit Fe(II), 2OG und Sauerstoff auch in der Lage, sich selbst an den Lysinen K111 und K167 zu hydroxylieren. Diese reinen in-vitro Daten konnten ähnlich wie bei der U2AF65 Hydroxylierung (s.o.) in-vivo an immunpräzipitiertem endogenem Jmjd6 bestätigt werden. Dafür wurde endogenes Jmjd6 mit dem polyklonalen anti-Jmjd6 Antikörper ab10526 (Abcam) präzipitiert, mit LysC-Protease verdaut und anschließend im Massenspektrometer (LC-MS/MS) analysiert. Die Analyse ergab auch für das endogene Jmjd6 ein Hydroxy-Lysin an Position K167 (siehe Abb. 38). Über die Funktion dieser Auto-Hydroxylierung in vivo können noch keine Aussagen getroffen werden.

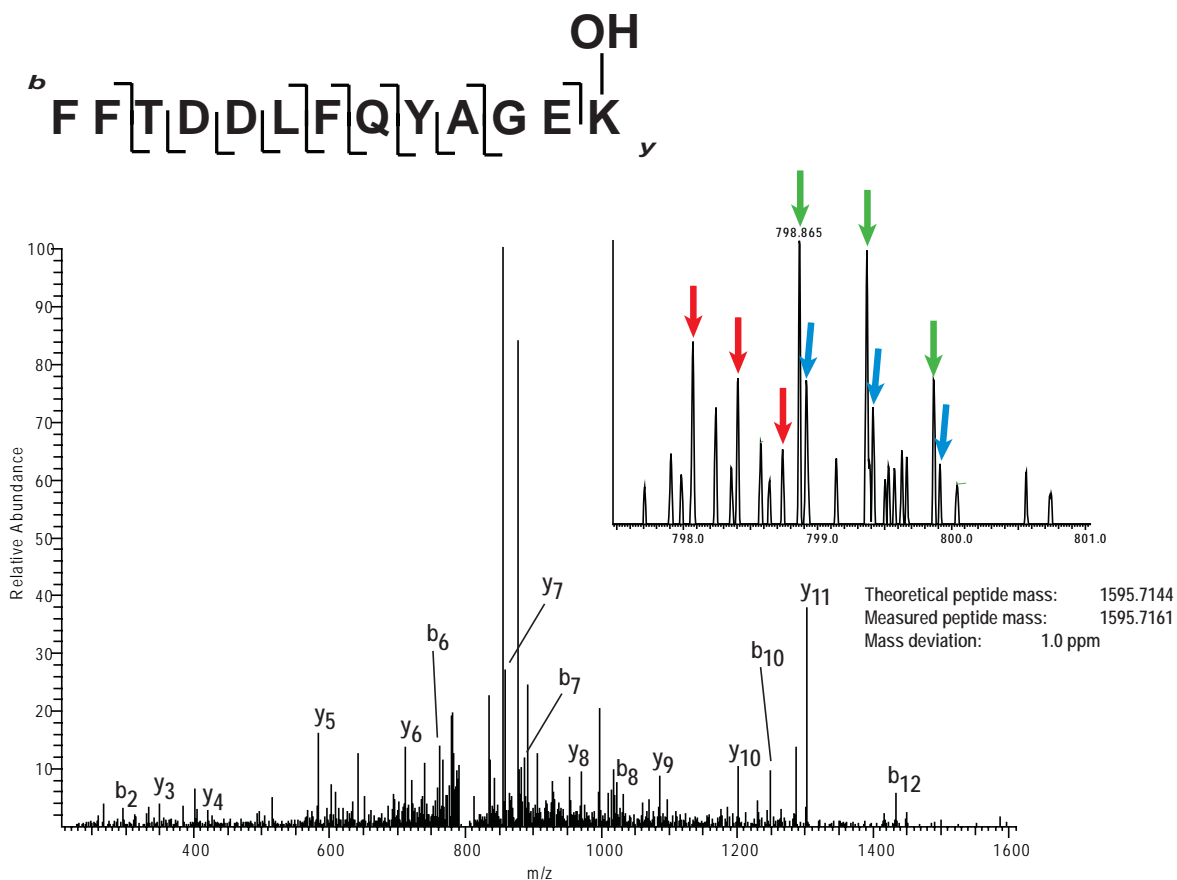


Abb. 38 | Lysin167 Hydroxylierung in endogenem Jmjd6: Endogenes Jmjd6 wurde immunpräzipitiert, mit LysC-Protease verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert (LC-MS/MS). Das zur Fragmentierung ausgewählte Peptid mit K167 ist angezeigt. MS-Spektrum der Fragmentierung des hydroxylierten Peptids (unten). Das MS-Spektrum des Peptids ist im kleinen Bild oben rechts in grün gezeigt. Gleichzeitige Koelution zweier anderer Peptide (blau, rot).

2.5 JMJD6 – EINFLUSS AUF SPLEIßEN

Bisher konnten essentielle Spleißproteine, wie U2AF65 und humane Luc7-Homologe als Bindepartner von Jmjd6 charakterisiert werden. Mit der Lysyl-5 Hydroxylaseaktivität von Jmjd6 ist eine enzymatische Aktivität des Proteins aufgeklärt und die bisher unbekannte posttranslationale Modifikation ist auch in-vivo nachgewiesen. Es lag nun nahe, dass die Jmjd6-Aktivität einen Einfluss auf Spleißen und pre-mRNA-Prozessierung hat.

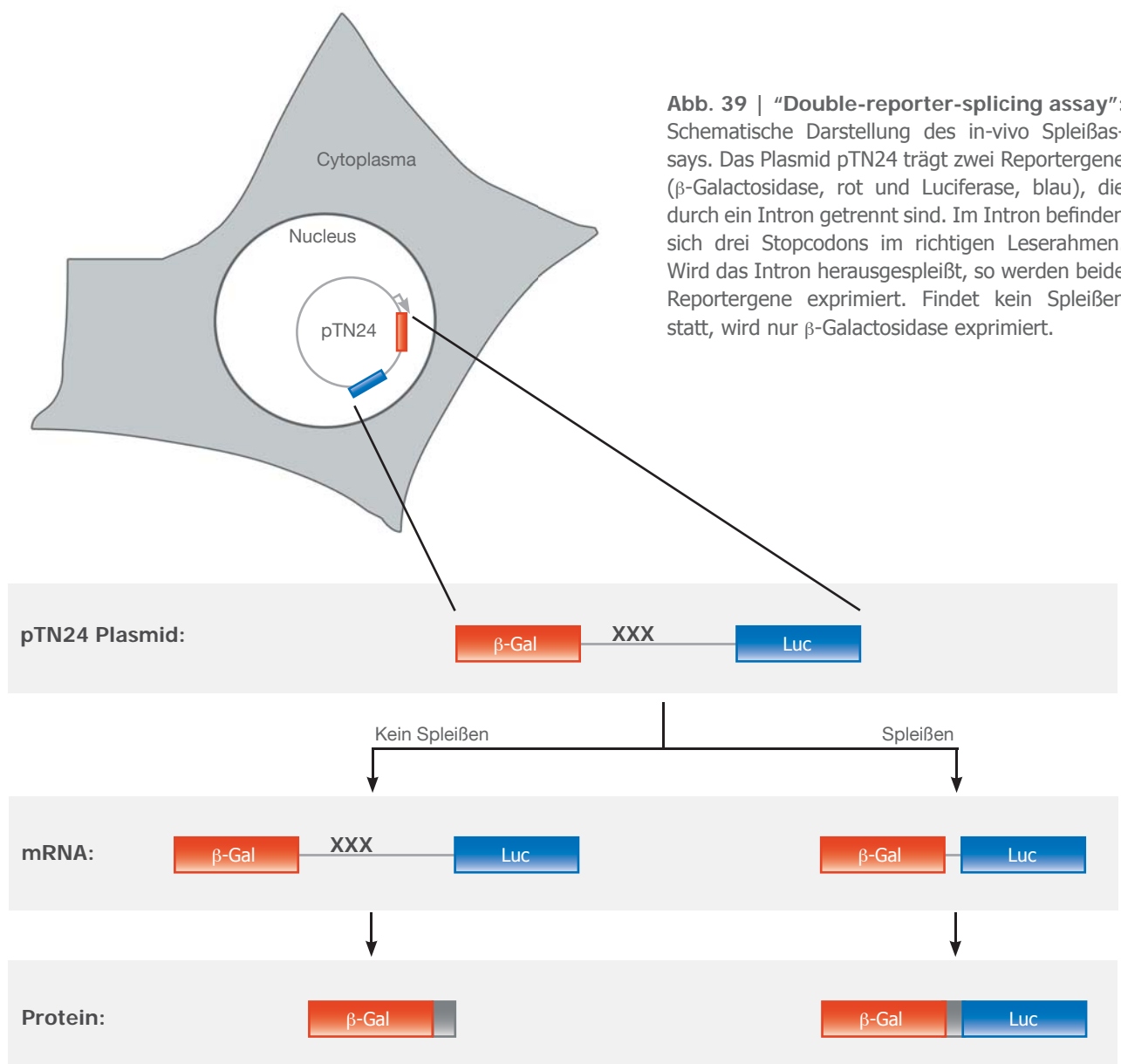
2.5.1 “DOUBLE-REPORTER-SPLICING-ASSAY”

Der “double-reporter-splicing-assay” liefert die Möglichkeit, das konstitutive Spleißen in Säugerzellen zu quantifizieren (Nasim & Eperon, 2006; Nasim MT et al, 2002). Hierfür wird ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase (β -Gal) und Luciferase (Luc) transient überexprimiert. Die beiden Reportergene sind durch ein Intron getrennt, das drei Translations-STOP-Signale im richtigen Leserahmen trägt. Wird das Intron durch Spleißen herausgeschnitten, so werden beide Reportergene exprimiert. Findet kein Spleißen statt, wird die Translation durch das STOP-Codon abgebrochen und es wird nur β -Gal exprimiert (siehe Abb. 39). Misst man das Verhältnis Luc- zu β -Gal-Enzymaktivität so lassen sich Aussagen über die Spleißeffektivität im benutzten System treffen. Um den eventuellen Einfluss von Jmjd6 auf Spleißen zu messen, wurden Jmjd6-Überexpression und Jmjd6 “knock-down” im “double-reporter-splicing-assay” getestet.

Überexpression von Jmjd6

HeLa-Zellen wurden transient mit pTN24 (Reportergene β -Galactosidase und Luciferase) und pcDNA3-Jmjd6 transfiziert. Alternativ wurde die Jmjd6-Mutante ASM2 mit mutiertem Fe(II)-Bindemotiv überexprimiert. Als Kontrollen dienten der leere pcDNA3-Vektor, sowie Hydra Insulin1 in pcDNA3-Vektor, welches keinen Einfluss auf Spleißen haben sollte. Die korrekte Überexpression von Jmjd6 und ASM2 wurde immer in einem Western Blot mit anti-Jmjd6-Antikörper kontrolliert (siehe Abb. 40 A). Setzte man die gemessene Luciferase-Aktivität ins Verhältnis zu β -Gal-Aktivität (Luc/ β -Gal), so ergab sich in Kontrollzellen ein Verhältnis von eins. Bei Überexpression von Jmjd6 fand sich eine Reduktion der Spleißaktivität um knapp 50%. HyIns1-Überexpression hatte keinen Einfluss auf Spleißen.

Dagegen hatte die Jmjd6-Mutante ASM2 eine ähnliche hemmende Wirkung auf den konstitutiven Spleißprozess, wie Wildtyp-Jmjd6 (siehe Abb. 40 B). Die Luc- und β -Gal-Enzymaktivität misst die Spleißeffektivität auf Proteinebene. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht das Spleißen, sondern ein anderer, folgender Schritt des Expressionsprozesses von Jmjd6 beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde die Spleißeffektivität auch auf mRNA-Ebene gemessen. Dazu wurde die gesamte mRNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, um dann eine semi-quantitative RT-PCR ("real-time" PCR) zu machen. Es wurden Primer benutzt, die das Intron einschließen und somit, je nachdem ob Spleißen stattfindet oder nicht, zwei verschieden große PCR-Produkte liefern



(ca. 600 und 800 Nukleotide). Nasim MT et al hatten für untransfizierte 293T-Zellen festgestellt, dass etwa 50% der Transkripte des pTN24-Plasmids im "double-reporter-splicing-assay" gespleißt werden. Nach RT-PCR waren die beiden Spleißprodukte etwa in gleicher Menge vorhanden (Nasim MT et al, 2002). Vergleicht man die Intensität der Banden der PCR-Produkte nach Jmjd6-Überexpression mit den Kontrollen im Agarosegel, so bestätigte sich das Ergebnis der Luc- und β -Gal-Enzymaktivität auch auf mRNA-Ebene. Bei Überexpression des leeren Vektors bzw. des HyIns1-Proteins waren beide Spleißprodukte in gleicher Menge vorhanden. Bei Jmjd6-Überexpression verschob sich dagegen das Verhältnis deutlich zum langen, ungespleißten PCR-Produkt (siehe Abb. 41). Das Ergebnis des "double-reporter-splicing-assays" zeigt, dass Jmjd6 Überexpression die Spleißaktivität hemmt. Der Effekt eines Jmjd6 Knock-downs wurde im selben "Assay" getestet.

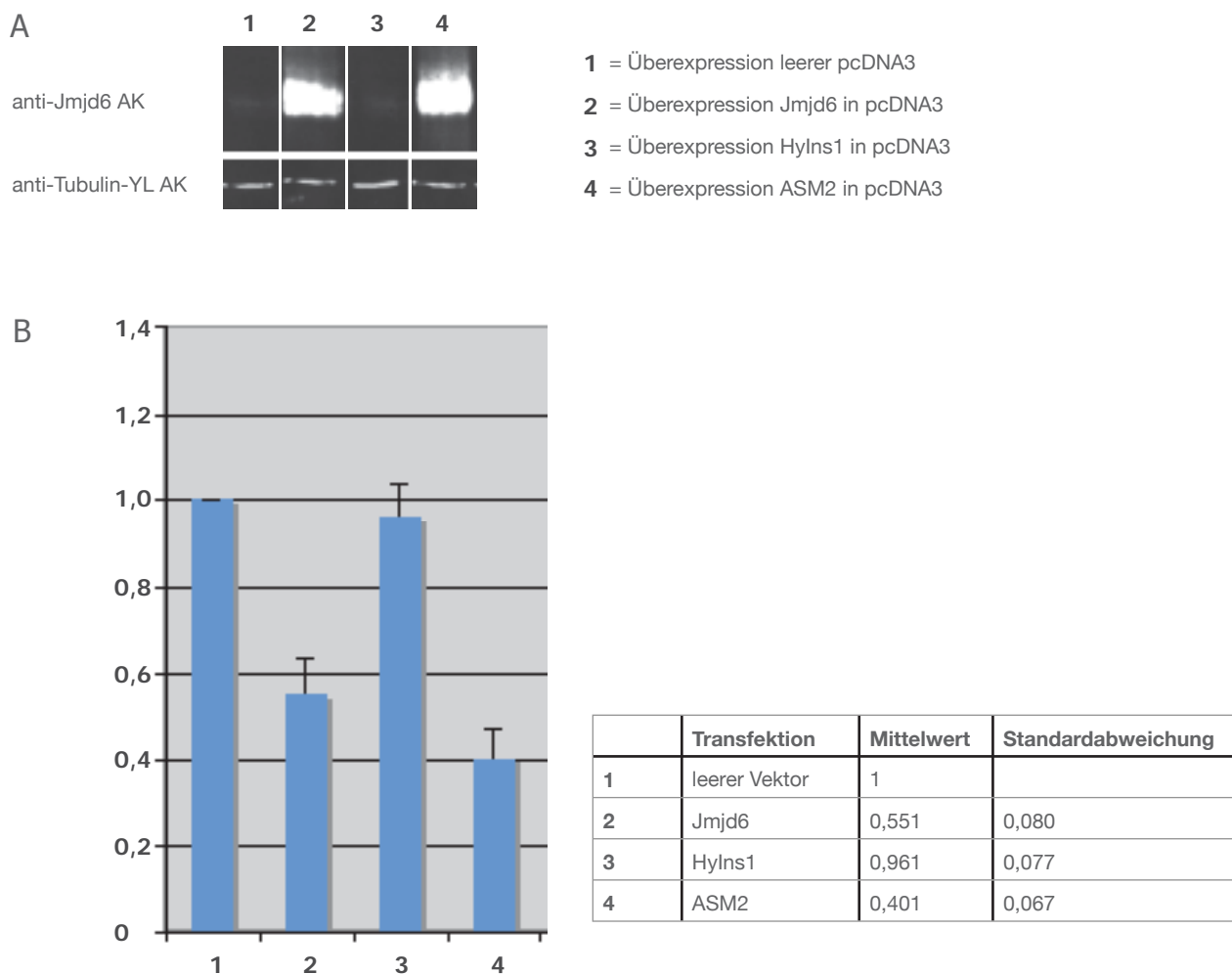


Abb. 40 | "Double-reporter-splicing-assay" nach Jmjd6-Überexpression - Teil 1: (A) HeLa-Zellysate nach transienter Transfektion verschiedener Expressionsvektoren (1-4) wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen und anschließend "geblottet". Western Blot mit anti-Jmjd6-Antikörper (ab10526, Abcam) gefärbt. (B) Enzymaktivitätsverhältnis Luciferase/ β -Galactosidase. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.



Abb. 41 | "Double-reporter-splicing-assay" nach Jmjd6-Überexpression - Teil 2: Semi-quantitative RT-PCR nach mRNA-Präparation aus verschiedenen HeLa-Zellpopulationen (1-3) und anschließender cDNA-Synthese. Die beiden PCR-Produkte variieren in Abhängigkeit von Spleißen. Ohne Spleißen ergeben sich etwa 800 Nukleotide, nach Spleißen nur noch 600. In den Kontrollen (1, 3) sind etwa 50% der Transkripte gespleißt. Bei Überexpression von Jmjd6 sind ähnlich wie im Enzymassay weitaus mehr Transkripte ungespleißt (ca. 80:20, ungespleißt:gespleißt).

Jmjd6 "knock-down" mit siRNAs

Um Jmjd6 in HeLa-Zellen herunter zu regulieren, wurden zwei verschiedene siRNAs getestet (stealth siRNAs, Invitrogen). Die siRNA 132 korrespondiert zu den Nukleotiden 132-156 und die siRNA 275 korrespondiert zu den Nukleotiden 275-299 des Jmjd6-ORFs ("open-reading-frames"). Die Kontroll siRNA 275-control hat kein Gegenstück in der Jmjd6-Sequenz. Als zweite Kontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA ("mock") transfiziert. Beide siRNAs waren gleichermaßen in der Lage, die Jmjd6-Expression auf etwa 5% zu reduzieren, während die Kontroll siRNA keinen Einfluss hatte. Nachgewiesen wurde dies in einem Western Blot mit anti-Jmjd6 Antikörper (siehe Abb. 42 A).

Verglich man das Verhältnis der Luc-/β-Gal-Enzymaktivität in den "knock-down" Zellen mit dem in Kontrollzellen, so erkannte man einen leichten Anstieg der Spleißaktivität um 20-30% nach Unterdrückung der Jmjd6-Expression durch siRNAs (siehe Abb. 42 B).

2.5.2 EINFLUSS VON JMJD6 AUF U2AF65- UND SC35-KERNVERTEILUNG

In 2.1.2 wurde gezeigt, dass es eine partielle Kolokalisation von Jmjd6 mit dem SR-Protein SC35 gibt (siehe Abb. 10). Doppelfärbungen mit anti-U2AF65 und anti-Jmjd6 Antikörper in HeLa-Zellen machten deutlich, dass es, passend zu den Interaktionsstudien, auch eine partielle Kolokalisation zwischen diesen beiden Proteinen gibt (siehe Abb. 43). U2AF65 wird an spezifischen Lysinresten von Jmjd6 hydroxyliert (siehe 2.4.2). Bei Überexpression von Jmjd6 steigt die Häufigkeit der Hydroxylierung in-vivo an. Durch die Immunfluoreszenz mit anti-U2AF65 Antikörper an HeLa-Zellen die Jmjd6-GFP exprimieren, sollte geklärt werden, ob es durch Überexpression von Jmjd6-GFP eine

erkennbare Veränderung in der Verteilung oder der Intensität des endogenen U2AF65 im Kern gibt. Als Kontrolle wurde GFP (mit NLS) exprimiert. Die Versuche zeigten aber keine deutlich sichtbare Veränderung im Expressionsmuster von U2AF65 (siehe Abb. 44). Betrachtet man dagegen die Verteilung von endogenem SC35 nach Überexpression von Jmjd6-GFP in HeLa-Zellen, so war eine Auflösung der SC35-Domänen zu erkennen, die es bei GFP-Überexpression in diesem Maße nicht gab. Die Überexpression der Jmjd6-ASM2-Mutante (H187A + D189A) hatte nahezu denselben Effekt wie Wildtyp Jmjd6 (siehe Abb. 45). Das Auszählen von je ca. 200 HeLa-Zellkernen zeigte, dass

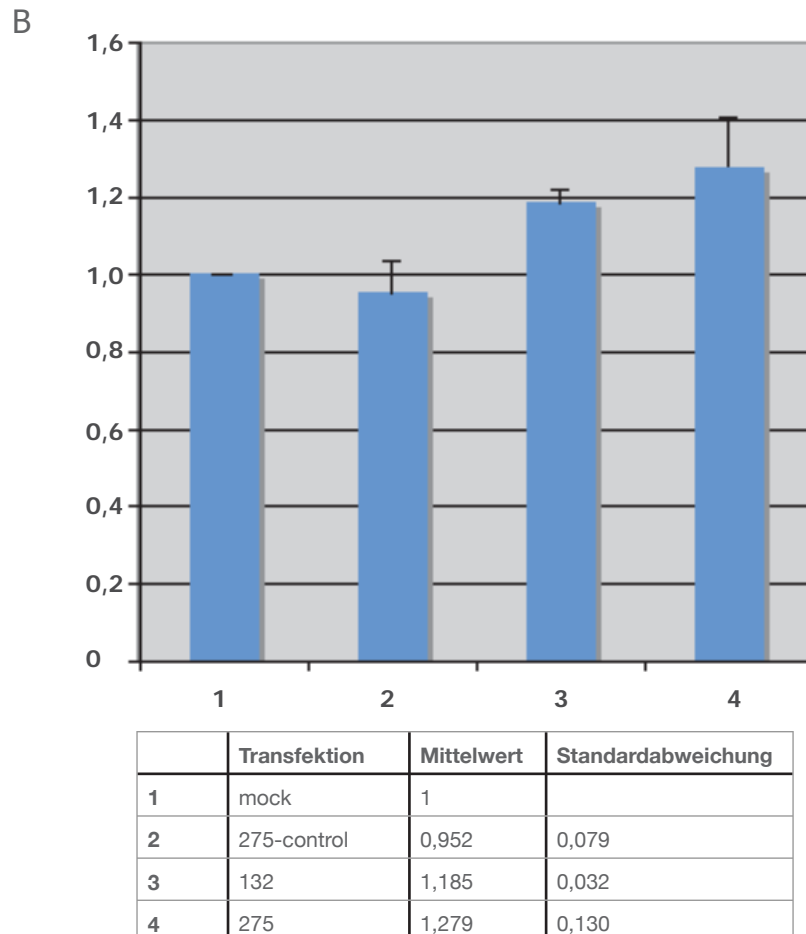
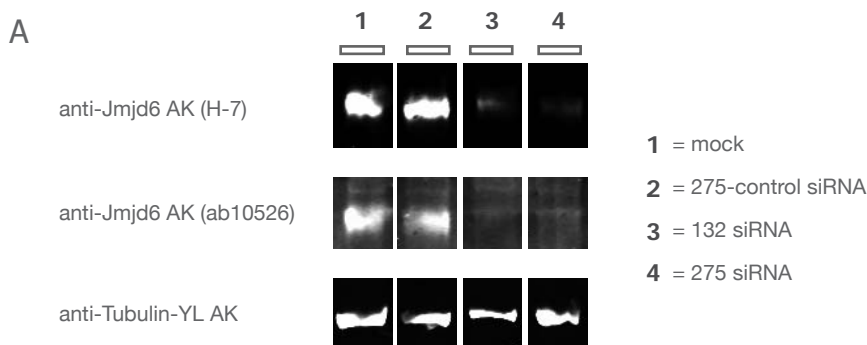


Abb. 42 | "Double-reporter-splicing-assay" nach Jmjd6 knock-down: (A) HeLa-Zellysate nach transienter Transfektion mit verschiedenen siRNAs (1-4) wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen und anschließend "geblottet". Western Blot mit anti-Jmjd6-Antikörper (ab10526, Abcam; H-7, santa cruz) zeigt den knock-down von Jmjd6 in 3 & 4. Kontroll siRNA und "mock"-Transfektion haben keinen Einfluss auf Jmjd6 Expression (1 & 2). (B) Enzymaktivitätsverhältnis Luciferase/ β -Galactosidase. Es ist ein Anstieg der Spleißaktivität nach Jmjd6 "knock-down" zu erkennen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

bei Jmjd6-Überexpression 78% den veränderten SC35-Phänotyp hatten (176 aus 226 Zellen). Bei ASM2-GFP Überexpression waren es 71% (170/238). Bei der Kontrolle mit GFP dagegen waren es nur 14% (28/200). Durch die Herunterregulation von Jmjd6 durch siRNA (132) war dagegen das SC35-Muster nicht sichtbar verändert (siehe Abb. 46).

2.6 JMJD6 IM NUKLEOLUS

Sowohl in der Immunfluoreszenz mit anti-Jmjd6 Antikörpern, als auch bei der Überexpression von Jmjd6-GFP wurden die Nukleoli von der Färbung größtenteils ausgespart. Nur vereinzelt gab es punktuelle Färbung in Teilbereichen der Nukleoli (siehe Abb. 43 & 13). Bei der Jmjd6-Mutante $\Delta 338-403$ veränderte sich diese Verteilung aber drastisch.

2.6.1 $\Delta 338-403$ JMJD6 AKKUMULIERT IM “FIBRILLAR CENTRE” DES NUKLEOLUS

Der Mutante $\Delta 338-403$ -Jmjd6 fehlen 65 Aminosäuren am C-Terminus, dabei geht der komplette Serin-reiche Sequenzabschnitt von Aminosäure 340-359 verloren. Durch diese Deletion veränderte sich die Kernverteilung des GFP-Fusionsproteins deutlich im Vergleich zum Wildtyp-Jmjd6-GFP. Ein

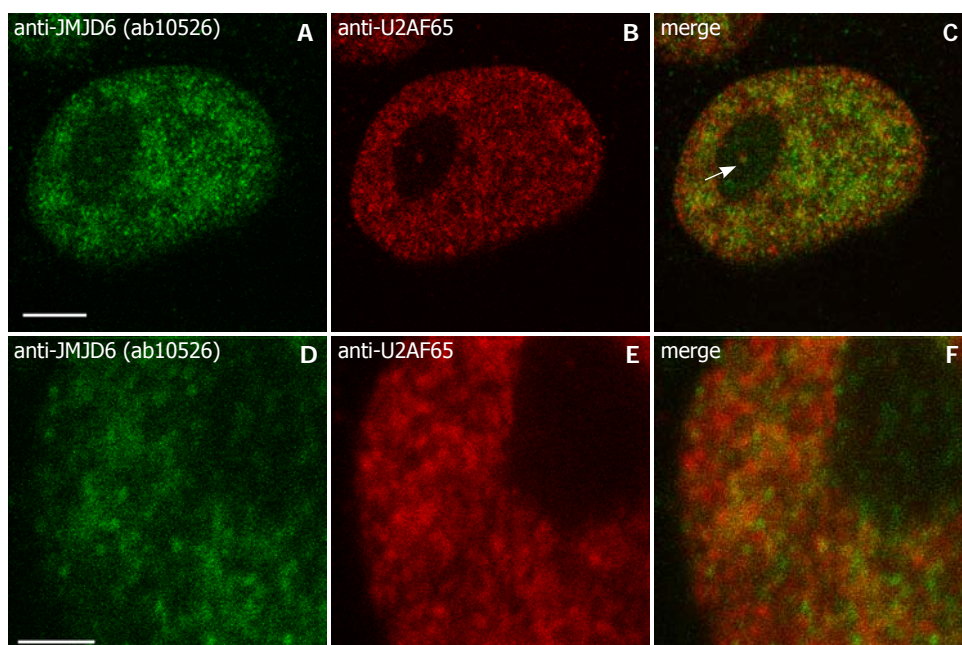


Abb. 43 | Antikörper-Doppelfärbung von Jmjd6 und U2AF65: HeLa-Zellen wurden fixiert und mit polyklonalem anti-Jmjd6 Antikörper (FITC-markierter Zweitantikörper) und monoklonalem anti-U2AF65 Antikörper (Cy3-markierter Zweitantikörper) gefärbt. Es ergibt sich eine partielle Kolo-kalisation der beiden Proteine, die auch in distinkten Bereichen des Nukleolus zu beobachten ist (siehe Pfeil). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab: 5 μ M (A-C); 2,5 μ M (D-F)

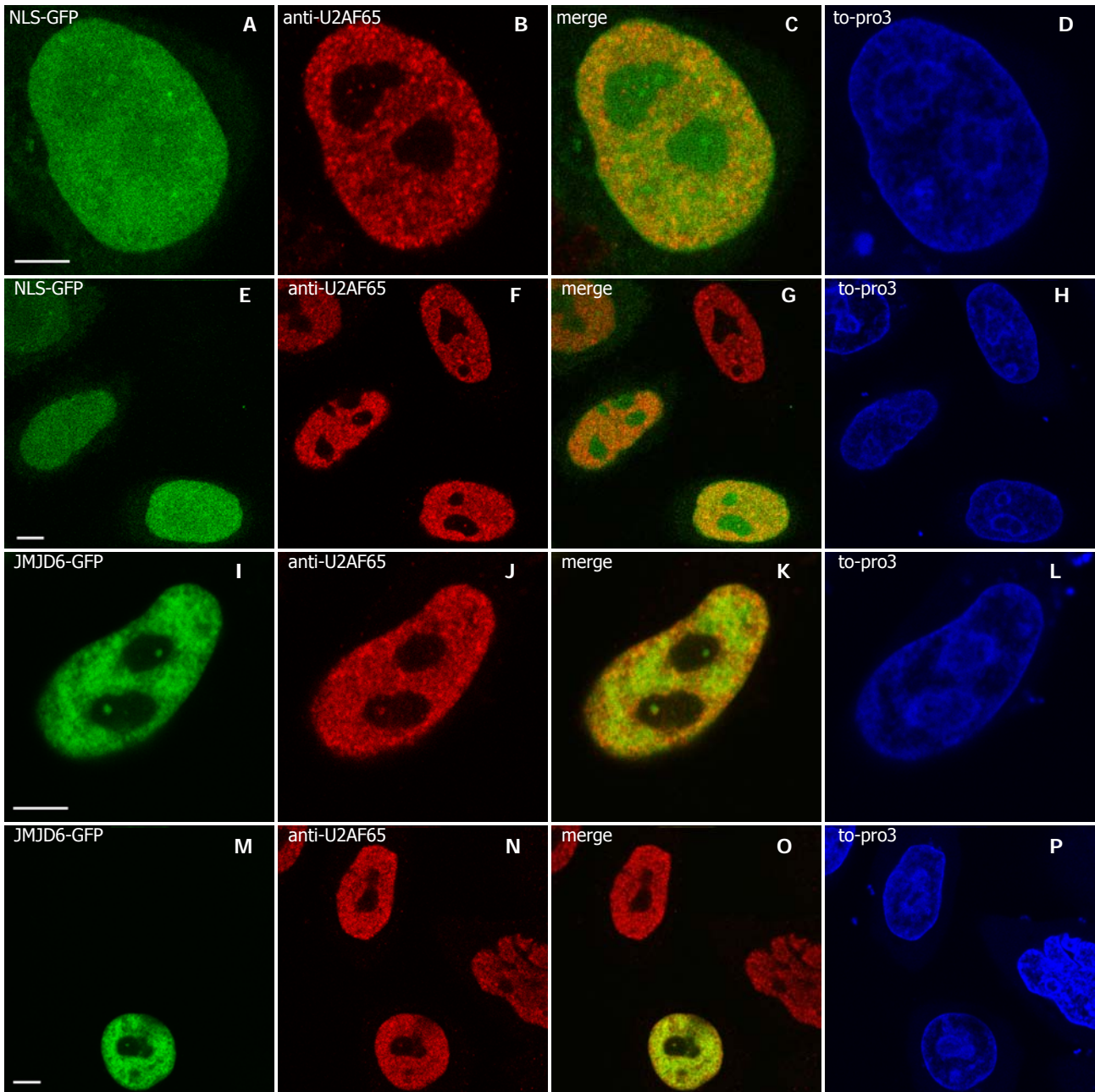


Abb. 44 | U2AF65-Expression in Jmjd6-GFP- und GFP-exprimierenden HeLa-Zellen: Die Zellen wurden transient mit Jmjd6-pEGFP-N1 (I-P) bzw. leerem pEGFP-N1-Vektor (NLS; A-H) transfiziert, 24 h nach Transfektion fixiert und mit monoklonalem anti-U2AF65 Antikörper (Cy3-markierter Zweitantikörper) gefärbt. Die Verteilung des endogenen U2AF65 veränderte sich durch die Überexpression von Jmjd6-GFP nicht sichtbar, im Vergleich zur GFP-Kontrolle oder untransfizierten Zellen. DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

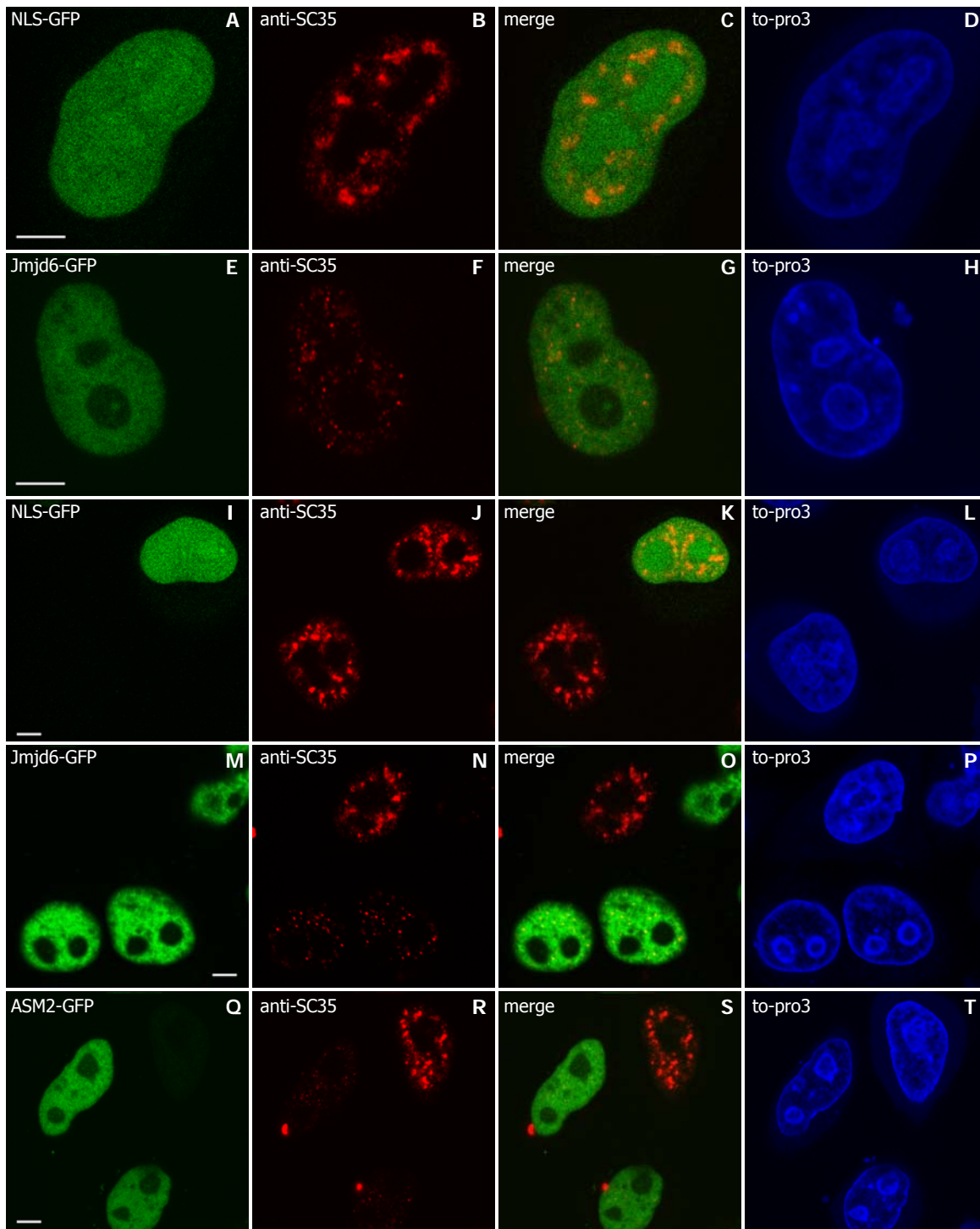


Abb. 45 | SC35-Expression in Jmjd6-GFP-, ASM2-GFP- und GFP-exprimierenden HeLa-Zellen: Die Zellen wurden transient mit Jmjd6-pEGFP-N1 (E-H, M-P), ASM2-pEGFP-N1 (Q-T) oder leerem pEGFP-N1-Vektor (NLS; A-D, I-K) transfiziert, 24 h nach Transfektion fixiert und mit monoklonalem anti-SC35 Antikörper (Cy3-markierter Zweitantikörper) gefärbt. SC35 bildet normalerweise etwa 10-30 sog. SC35-Domänen im Nukleoplasma aus. Dieser Phänotyp war durch die Überexpression von GFP nicht verändert (B+J). Dagegen führte die Überexpression von Jmjd6-GFP zu einer Auflösung der SC35-Domänen (F+N). Dieses Phänomen war auch bei Überexpression der ASM2-Mutante zu beobachten (R). DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

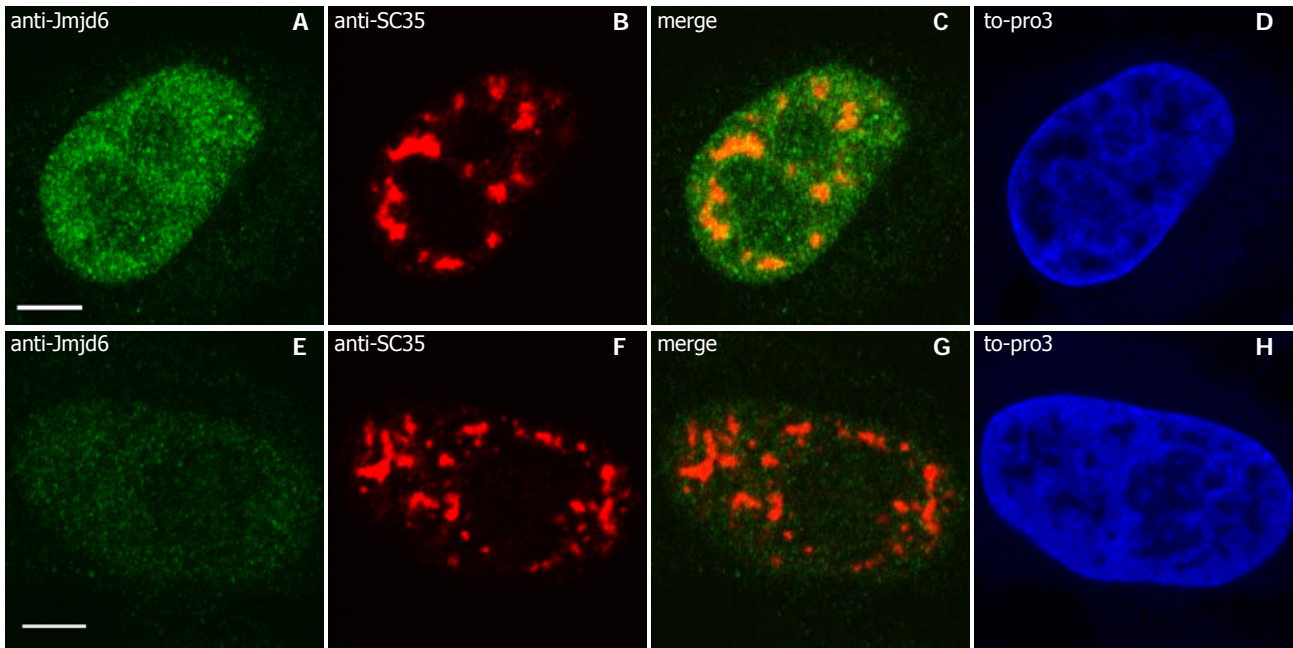
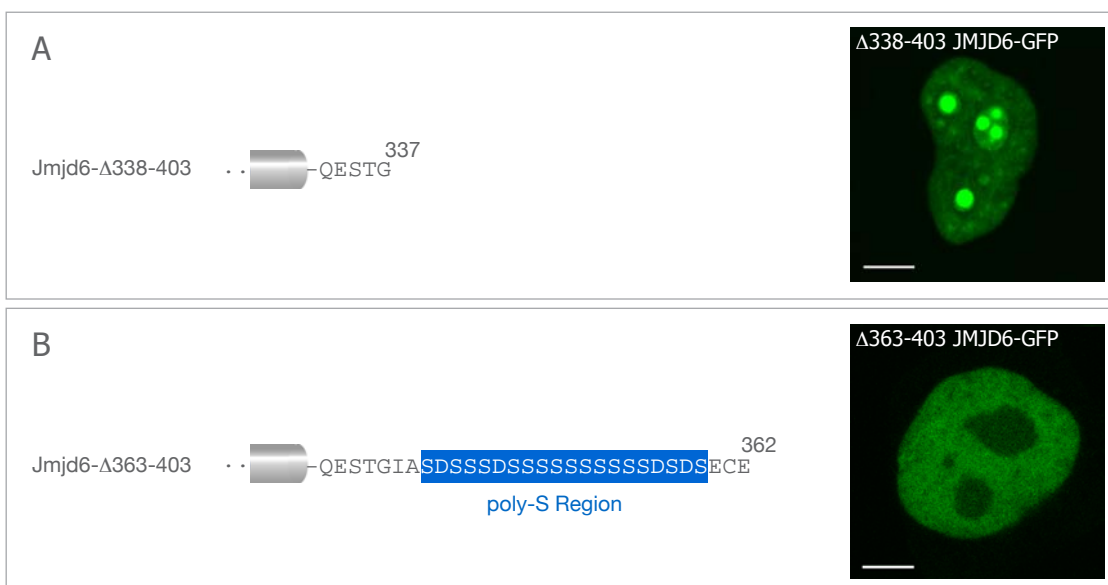


Abb. 46 | Antikörper-Doppelfärbung von Jmjd6 und SC35 in Jmjd6-„knock-down“ HeLa Zellen:

Durch Transfektion mit der siRNA 132 wurde Jmjd6 in HeLa-Zellen herunterreguliert (E-H). Die Kontrolle wurde ohne DNA („mock“) transfiziert (A-D). Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit polyklonalem anti-Jmjd6 Antikörper (ab10526, Abcam; FITC-markierter Zweitantikörper) und monoklonalem anti-SC35 Antikörper (Cy3-markierter Zweitantikörper) gefärbt. Es war kein deutlicher Unterschied in der endogenen SC35-Expression zu erkennen. DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

Abb. 47 | Δ 338-403 Jmjd6 akkumuliert im Nukleolus: Die C-terminalen Jmjd6-Deletionsmutanten Δ 338-403 und Δ 363-403 unterscheiden sich durch die serin-reiche Sequenz zwischen Aminosäure 340-359 (blau). Beide Mutanten werden ausschließlich im Kern exprimiert, aber die Lokalisation im Kern ist deutlich unterscheidbar. Während Δ 363-403-Jmjd6-GFP (B) der Wildtyp-Jmjd6-GFP Verteilung ähnelte, so akkumulierte Δ 338-403-Jmjd6-GFP stark in den Nukleoli (A). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m



Großteil des $\Delta 338-403$ -Jmjd6-GFP akkumulierte in den Nukleoli (47 A). Bei der Mutante, die die Serin-reiche Sequenz wieder trägt ($\Delta 363-403$) war dieses Phänomen dagegen nicht mehr zu erkennen (siehe Abb. 47 B).

Der Nukleolus lässt sich in drei Kompartimente gliedern, benannt nach ihrem Aussehen im Elektronenmikroskop. Im FC ("fibrillar centre") und im Grenzbereich zum DFC ("dense fibrillar component") findet die Transkription der ribosomalen DNA (rDNA) statt. Im DFC werden die pre-ribosomalen RNAs gespleißt und modifiziert. Abschließend werden sie im GC ("granular component") mit den ribosomalen Proteinen assembliert (Boisvert FM et al, 2007) (siehe Abb. 48). Die drei Bereiche des Nucleolus (FC, DFC, GC) können durch Antikörperfärbung gegen spezifische Markerproteine in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Der Transkriptionsfaktor Upstream Binding Factor (UBF) ist Teil der RNA-Polymerase I Transkriptionsmaschinerie und charakterisiert das FC (Sirri V et al, 2008). Fibrillarin dagegen ist ein Marker für das DFC. Das Protein ist Teil nukleolärer snRNPs, die an der Prozessierung der pre-ribosomalen rRNA beteiligt sind (Reichow SL et al, 2007). Pescadillo spielt bei der Ribosomen-Biogenese eine Rolle und dient als Markerprotein für das GC (Lerch-Gaggli A et al, 2002).

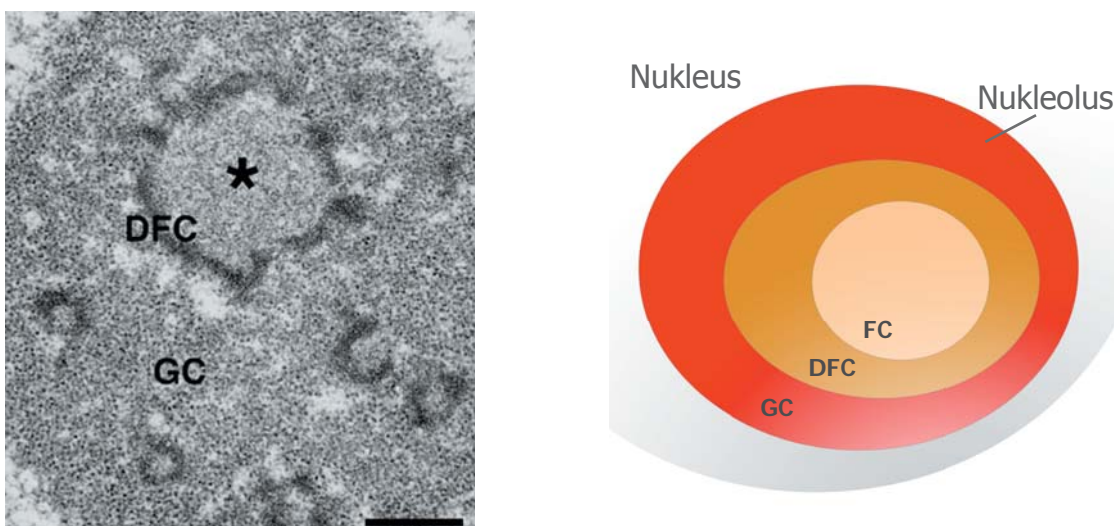


Abb. 48 | Der Nukleolus ist in drei Kompartimente unterteilt: Elektronenmikroskopische Aufnahme (links) eines Nukleolus aus Sirri V et al, 2008. Die drei Kompartimente lassen sich strukturell gut unterscheiden. Das Fibrillar Centre (FC, *) ist vom Dense Fibrillar Component (DFC) umgeben und dieses ist wiederum in das Granular Component (GC) eingebettet. Ein Nukleolus kann mehrere Fibrillar Components besitzen. Schematische Darstellung eines Nukleolus auf der rechten Seite. Maßstab = 0,5 μm

$\Delta 338-403$ -Jmjd6-GFP (pEGFP-N1) wurde in HeLa-Zellen überexprimiert und anschließend mit anti-UBF, anti-Fibrillarin oder anti-Pescadillo Antikörper gegengefärbt. Dadurch ließ sich klar erkennen, dass die starke nukleoläre Lokalisation der Mutante mit der UBF-Färbung übereinstimmt und somit auf das FC im Nukleolus beschränkt ist (siehe Abb. 49).

2.6.2 WILDTYP JMJD6 IM NUKLEOLUS

Wildtyp Jmjd6 lieferte bei GFP-Überexpression ein distinktes Signal in Teilbereichen des Nukleolus. Nach demselben Prinzip wie bei der $\Delta 338-403$ -Jmjd6 Mutante (s.o.) sollte auch für Jmjd6 die nukleoläre Lokalisation genauer charakterisiert werden. Dabei zeigte sich nach Jmjd6-GFP Überexpression keine Kolokalisation mit dem anti-Fibrillarin bzw. dem anti-Pescadillo Antikörper (siehe Abb. 50). Aber anders als bei der $\Delta 338-403$ -Jmjd6-Mutante gab es auch mit anti-UBF Antikörperfärbung keine stark konzentrierte Kolokalisation. Vielmehr stimmten nur vereinzelte UBF-Signale mit dem nukleolären Jmjd6-GFP überein. Ein weiterer Effekt der Jmjd6-Überexpression war ein deutlich schwächeres anti-UBF-Signal im Vergleich zu nicht-überexprimierenden oder GFP-überexprimierenden Zellen (siehe Abb. 51).

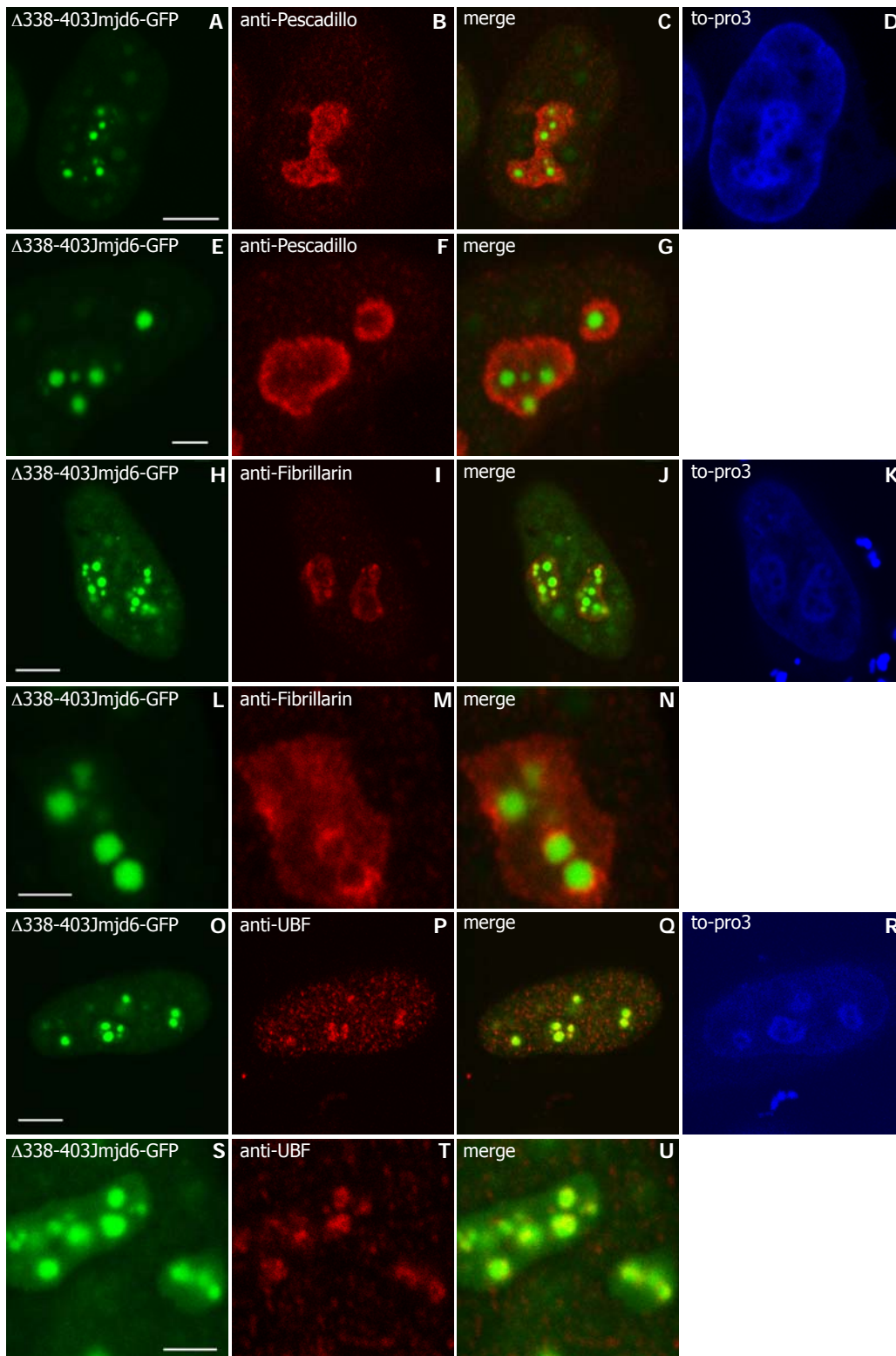


Abb. 49 | $\Delta 338-403$ -Jmjd6 Mutante akkumuliert im Fibrillar Centre des Nukleolus: Transiente Überexpression von $\Delta 338-403$ -GFP in HeLa-Zellen. Färbung mit anti-Pescadillo Antikörper (Granular component, GC, des Nukleolus) (A-G), anti-Fibrillarin Antikörper (Dense Fibrillar Centre, DFC) (H-N) oder anti-Upstream Binding Factor Antikörper (Fibrillar Centre, FC) (O-U). Vergrößerter Ausschnitt eines Kerns (E-G, L-N, S-U). In allen Fällen Cy3-markierter Zweitantikörper. DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m (A-D, H-K, O-R); 2 μ m (E-G, L-N, S-U)

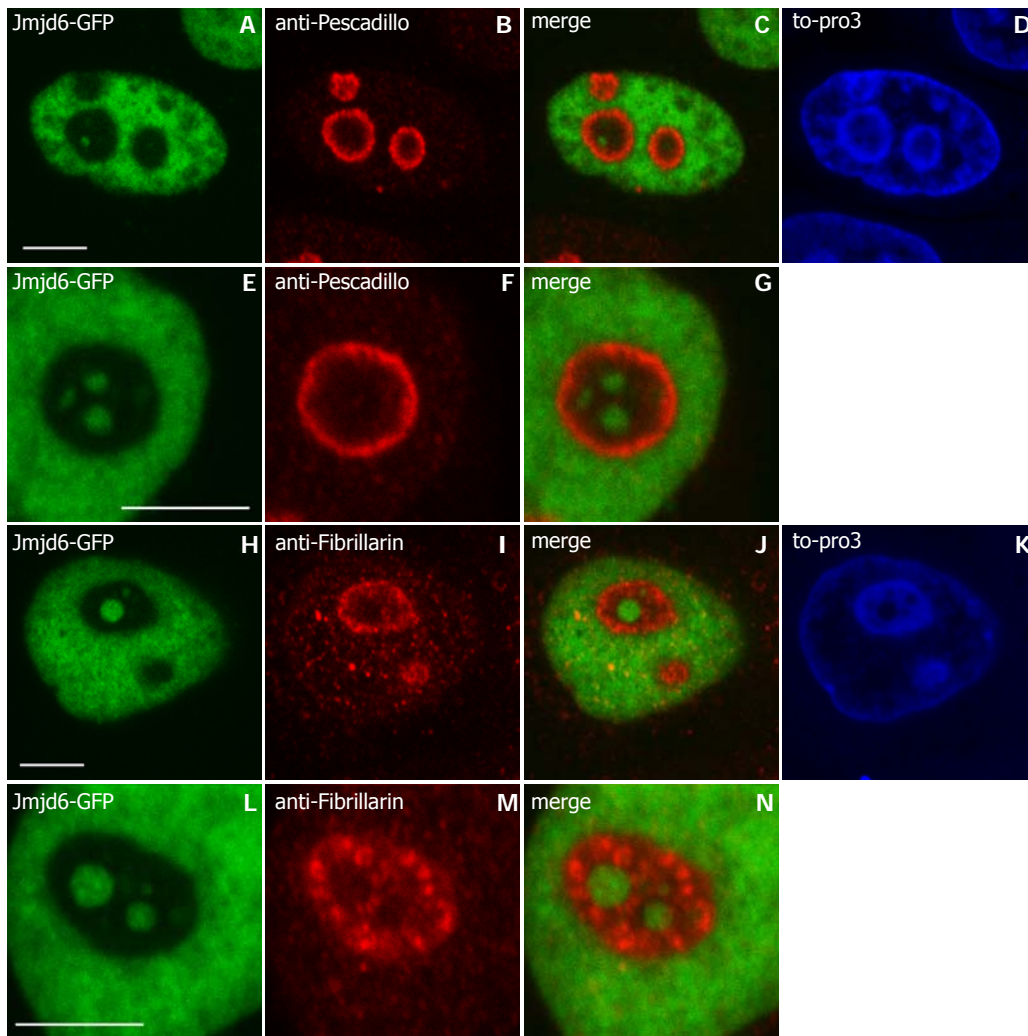


Abb. 50 | Jmjd6 im Nukleolus - Teil 1: Wildtyp-Jmjd6-GFP Überexpression zeigte punktuelle Färbung in Teilbereichen des Nukleolus von HeLa-Zellen. Färbung mit anti-Pescadillo Antikörper (Granular Component, GC; Cy3-markierter Zweitantikörper) (A-G) und anti-Fibrillarin (Dense Fibrillar Centre, DFC; Cy3-markierter Zweitantikörper) (H-N) zeigten keine Kolokalisation mit dem nukleolären Jmjd6-GFP Signal. Vergrößerter Ausschnitt eines Kerns (E-G, L-N). DNA-Färbung mit to-pro3 (Invitrogen). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 5 μ m

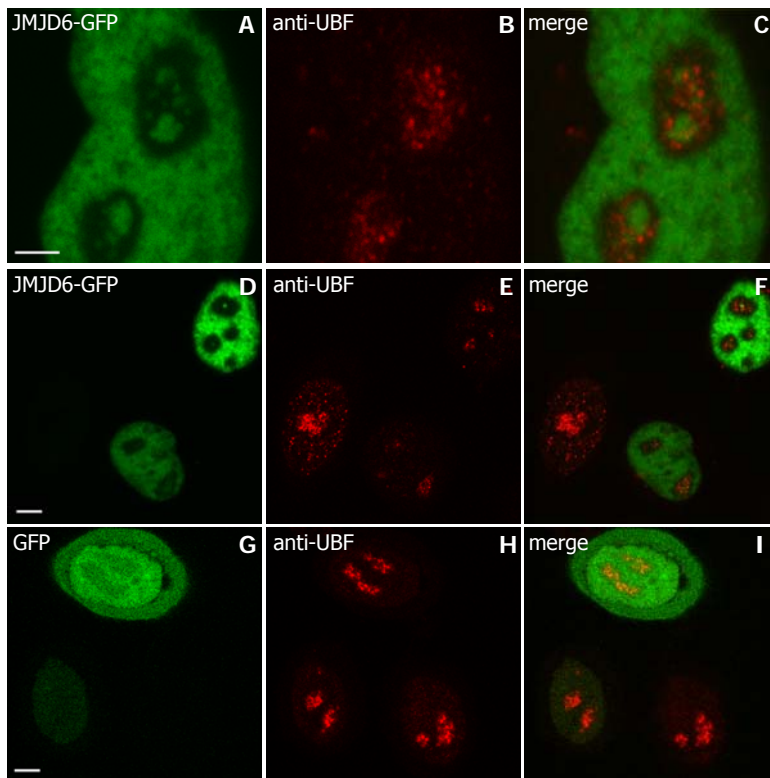


Abb. 51 | Jmjd6 im Nukleolus - Teil 2: Das nukleoläre Signal des Wildtyp Jmjd6-GFP zeigte nur eine sehr partielle Kolokalisation mit dem anti-UBF Signal (A-C). Anders als die $\Delta 338-403$ Jmjd6-Mutante, bei der nahezu das komplette UBF-Signal im Nukleolus mit dem GFP-Signal überlappte (siehe Abb. 49). Ein weiterer Unterschied ist die Expressionsstärke des endogenen UBF. In HeLa-Zellen, die Jmjd6-GFP überexprimieren ist das UBF Signal schwächer als in untransfizierten (D-F). Bei Überexpression von GFP konnte man diesen Effekt nicht beobachten (G-I). Jedes Bild entspricht einem konfokalen Schnitt durch die Mitte des Kerns. Maßstab = 2,5 μm (A-C), 5 μm (D-H)

Protein	Acc. Nr.	Funktion
hLuc7A (CROP protein)	O95232	pre-mRNA Prozessierung
Putative RNA-binding protein Luc7-like 1 (hLuc7B1)	Q9NQ29	pre-mRNA Prozessierung
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 (hLuc7B2)	Q9Y383	pre-mRNA Prozessierung
Poly-U binding splicing factor PUF60	Q9UJY7	pre-mRNA Prozessierung
Splicing factor U2AF 65kD subunit	P26368	pre-mRNA Prozessierung
Splicing factor U2AF 35kD subunit	Q01081	pre-mRNA Prozessierung
RNA-binding protein 39 (Splicing factor HCC1)	Q14498	pre-mRNA Prozessierung
Arginine/serine-rich coiled coil protein 1	Q96IZ7	pre-mRNA Prozessierung
Acinus (Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus)	Q9UKV3	pre-mRNA Prozessierung
RNA binding motif protein 25	P49756	pre-mRNA Prozessierung
RNA binding protein	Q9UQ39	pre-mRNA Prozessierung
Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	O75400	pre-mRNA Prozessierung
ATP-dependent RNA helicase DDX41	Q9UJV9	pre-mRNA Prozessierung
ATP-dependent RNA helicase DDX46	Q7L014	pre-mRNA Prozessierung
ATP-dependent RNA helicase DDX17 (p72)	Q92841	pre-mRNA Prozessierung
Splicing factor arginine/serine rich 11 (p54)	Q05519	pre-mRNA Prozessierung
Cleavage and polyadenylation specificity factor 6	Q16630	pre-mRNA Prozessierung
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 (Dyskerin)	O60832	Nukleolus
Nucleolar phosphoprotein p130	Q14978	Nukleolus
Nucleolar RNA helicase II (DDX21)	Q9NR30	Nukleolus
Treacle protein (Treacher Collins syndrome protein)	Q13428	Nukleolus
Nuclease sensitive element binding protein 1	P67809	Transkription
DNA-binding protein A	P16989	Transkription
NF-kappa-B-activating protein	Q8N5F7	Transkription
Parafibromin (Cell division cycle protein 73 homolog)	Q6P1J9	Transkription
RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	Q92541	Transkription
Bromodomain-containing protein 4	O60885	DNA-Bindung
Hepatoma derived growth factor 2	Q7Z4V5	DNA-Bindung (HDGF-Familie)
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	Translation
60S ribosomal protein L5	P46777	Translation
40S ribosomal protein S3	P23396	Translation
40S ribosomal protein S8	P62241	Translation
Ribosomal protein S14	P62263	Translation
40S ribosomal protein S28	P62857	Translation
60S Ribosomal protein L37a	P61513	Translation
60S ribosomal protein L18a	Q02543	Translation
40S ribosomal protein S17	P08708	Translation

Abb. 52 | Liste aller potentiellen Jmjd6-Interaktionspartner nach TAP-tag-Versuch: Durch "MudPIT" identifizierte, im Jmjd6-TAP-tag ko-präzipitierte Proteine mit Acc.Nr. (NCBI) und aus der Literatur bekannter Funktion.

Protein	Acc. Nr.	Funktion
60S ribosomal protein L10	P27635	Translation
60S ribosomal protein L18	Q07020	Translation
40S ribosomal protein S6	P62753	Translation
60S ribosomal protein L14	P50914	Translation
40S Ribosomal protein S19	P39019	Translation
60S Ribosomal protein L11	P62913	Translation
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 4	O75821	Translation
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	Q99613	Translation
Elongation factor 1-alpha 2	Q05639	Translation
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	Hsp70 Chaperon Familie (Kern)
Heat shock 70kD protein 1	P08107	Hsp70 Chaperon Familie (Cytoplasma)
Heat shock 70kD proein 1L	P34931	Hsp70 Chaperon Familie (Cytoplasma)
78 kD Glucose-regulated protein precursor	P11021	Hsp70 Chaperon Familie (ER)
T-complex protein 1 alpha subunit	P17987	TCP1-Chaperon-Komplex (Cytoplasma)
T-complex protein 1 delta subunit	P50991	TCP1-Chaperon-Komplex (Cytoplasma)
T-complex protein 1 theta subunit	P50990	TCP1-Chaperon-Komplex (Cytoplasma)
T-complex protein 1 gamma subunit	P49368	TCP1-Chaperon-Komplex (Cytoplasma)
Phosphatidylinositol-5 phosphate 4-kinase type II alpha	P48426	Kinase, Bildung von Phosphatidylinositol-5,4-bisphosphate (Cytoplasma)
Phosphatidylinositol-5 phosphate 4-kinase type II beta	P78356	Kinase, Bildung von Phosphatidylinositol-5,4-bisphosphate (Kern)
Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-II gamma	Q8TBX8	Kinase, Bildung von Phosphatidylinositol-5,4-bisphosphate (Cytoplasma)
Casein kinase 2A1	P68400	Serin/Threonin-Kinase (Cytoplasma + Kern)
Hypothetical protein FLJ32377	Q96MH4	unbekannte Funktion
RNF187 protein	AAH64481.1	unbekannte Funktion
Small acidic protein	O00193	unbekannte Funktion
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	Q9BU76	unbekannte Funktion
Mitochondrial 28S ribosomal protein S25	P82663	Mitochondrium
Mitochondrial ribosomal protein S7	Q96Q63	Mitochondrium
Mitochondrial 28S ribosomal protein S31	Q92665	Mitochondrium
Mitochondrial 28S ribosomal protein S35	P82673	Mitochondrium
Mitochondrial 28S ribosomal protein S14	O60783	Mitochondrium
Mitochondrial 28S ribosomal protein S18b	Q9Y676	Mitochondrium
Mitochondrial 28S ribosomal protein S9	P82933	Mitochondrium
Mitochondrial 28S ribosomal protein S29	P51398	Mitochondrium
PPR repeat containing protein	Q96EY7	Mitochondrium
ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	P25705	Mitochondrium

Protein	Acc. Nr.	Funktion
Stress-70 protein, mitochondrial precursor	P38646	Mitochondrium
PTCD3 protein	AAH01758.3	Mitochondrium
Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle	Q9H1R3	Skelettmuskelzellen
Tubulin alpha-1B chain	P68363	Cytoplasma
Signal recognition particle 14kD protein	P37108	Cytoplasma
Lysozyme C precursor	P61626	Extrazellulär

3. DISKUSSION

Jmjd6 gehört zur Gruppe der "JumonjiC-domain-containing" (JmjC) Proteine. Das charakteristische JmjC-Strukturmerkmal ist eine aus acht β -Strängen gebildete Fass-ähnliche Struktur ("jelly-roll motif") mit einem aktiven Zentrum, das Fe(II) und 2-Oxoglutarat (2-OG) komplexiert. Einem Teil der JmjC-Proteine konnte eine Oxygenase-Aktivität zugeordnet werden, die verschiedenste Funktionen erfüllen kann. So kann die AlkB-Proteinfamilie N-alkylierte DNA oxidativ demethylieren (Falnes et al, 2002), der "Factor Inhibiting HIF" (FIH) ist in der Lage Asparaginreste zu hydroxylieren (Lando et al, 2002) und auch Histon-Lysin-Demethylasen konnten in den letzten Jahren identifiziert werden (Klose RJ et al, 2006a). Neben der Jumonji-Domäne scheinen für die Funktion auch die zusätzlich vorhandenen Strukturmodule eine Rolle zu spielen. So haben etwa alle bisher identifizierten Histon-Lysin-Demethylasen zusätzlich mindestens eine DNA-Bindedomäne. Jmjd6 gruppiert bei einer phylogenetischen Analyse der JmjC-Proteine mit acht anderen Proteinen zu den "JmjC-domain-only" Proteinen, die keine bisher bekannte zusätzliche Domäne aufweisen (siehe Abb. 53 & Abb. 06; Klose RJ et al, 2006a). Jmjd6 besitzt die für die Fe(II)- und 2-OG-Bindung charakteristischen Aminosäuren. Die "jelly-roll" Sekundärstruktur der JmjC-Domäne wurde basierend auf der Sequenzähnlichkeit zu FIH ebenfalls prognostiziert (Cikala M et al, 2004). Seine ursprünglich publizierte Funktion als Phos-

Protein	Funktion
FIH (factor inhibiting HIF)	Asparagin-Hydroxylase; Regulation der Hypoxieantwort der Zelle; Cytosol (Elkins JM et al, 2003)
MINA53	Genprodukt eines c-myc Zielgens; Nukleäre und nukleoläre Lokalisation; Hochregulation in verschiedenen Krebsarten, z.B. Darmkrebs; Funktion unbekannt
NO66	Konstitutiv nukleoläres Protein; Funktion unbekannt (Eilbracht J et al, 2004)
PLA2G4B (Phospholipase 2)	Katalysiert die Hydrolyse von Esterbindungen verschiedener Phospholipide; Cytosol (Burke & Dennis, 2009).
HSPBAP1 (heat shock 27-kDa-associated protein 1)	Bindet spezifisch an Hsp27; Funktion unbekannt (Jiang M et al, 2001)
Jmjd5	keine Information
Jmjd4	keine Information
LOC339123	keine Information

Abb. 53 | "JmjC-domain-only" Proteine: Nach einer phylogenetischen Analyse aller JmjC-Proteine (Klose RJ et al, 2006a) gruppierte Jmjd6 mit acht weiteren Proteinen in der Gruppe "JmjC-domain-only" Proteine. Die Tabelle zeigt eine Auflistung der acht anderen Vertreter dieser Gruppe und ihre bisher bekannte Funktion.

phatidylserin-Rezeptor war zu Beginn dieser Promotion in Frage gestellt. Diese Arbeit zeigte, dass Jmjd6 ein Kernprotein ist, mit einer Reihe von Spleißfaktoren interagiert und bestimmte Peptidsubstrate, sowie den Spleißfaktor U2AF65 an Lysin hydroxyliert.

3.1 JMJD6 IST EINE LYSIN-5-HYDROXYLASE

Jmjd6 gehört zur Enzymgruppe der Fe(II)-2-OG-Dioxygenasen. Sowohl in-vitro, als auch in-vivo konnte eine Hydroxylaseaktivität am C5-Atom der Aminosäure Lysin nachgewiesen werden. Sowohl Peptide, als auch rekombinante Proteine wurden in-vitro von Jmjd6 an Lysinresten hydroxyliert. Die Peptide basierten auf den Sequenzen potentieller Jmjd6-Interaktionspartner aus dem "TAP-tag-Screen" (U2AF65, hLuc7A, hLuc7B2). Rekombinantes U2AF65 ("full-length") wurde im "Assay" mit Fe(II), 2-Oxoglutarat, Sauerstoff und Ascorbat spezifisch am Lysin K276 hydroxyliert. Diese Hydroxylierung und auch Hydroxy-K15 konnte nach U2AF65-Immunpräzipitation auch im endogenen Protein nachgewiesen werden. Dagegen konnten die korrespondierenden Peptide U2AF65₁₂₋₂₆ und U2AF65₂₇₄₋₂₈₇ von rekombinantem Jmjd6 nicht in-vitro hydroxyliert werden. Das spricht dafür, dass neben der Aminosäuresequenz noch andere Gegebenheiten die Substratspezifität des Jmjd6 bestimmen. Bei der strukturell verwandten Asparagin-Hydroxylase FIH ist dies z.B. eine signifikante Konformationsänderung in der "Ankyrin-repeat" Domäne des Notch Rezeptors, die eine Hydroxylierung desselben erst möglich macht (Coleman ML et al, 2007).

3.1.1 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN AN LYSIN

Hydroxy-Lysin ist an intrazellulären Proteinen eine bisher unbekannte posttranslationale Modifikation. Über eine mögliche Funktion der Hydroxylierung am U2AF65 kann bisher nur spekuliert werden. Bekannt ist Hydroxy-Lysin nur aus Kollagen und Proteinen mit Kollagen-ähnlichen Domänen der extrazellulären Matrix. In diesen Fällen ist die Modifikation Grundlage für spezifische "O-linked" Glykosylierungen und dient der Stabilität innerhalb der Kollagen-Triplehelix. Das verantwortliche Enzym Lysyl-Hydroxylase (LH) ist eine 2-OG-Dioxygenase im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und liegt beim Menschen in drei Isoformen vor (LH1, LH2, LH3; Myllylä R et al, 2007).

Lysine können das Ziel verschiedener posttranslationaler Modifikationen sein, wie etwa Methylierung, Acetylierung oder Ubiquitinylierung. Dabei kann es zum kompetitiven Wettbewerb verschiedener Modifikationen kommen. So können im Protein p53 fünf C-terminale Lysine entweder acetyliert oder ubiquitinyliert werden. Ubiquitinylierung hat den proteasomalen Abbau des p53-Proteins zur Folge, wohingegen die Acetylierung die Ubiquitinylierung verhindert und dadurch p53 erhalten bleibt (Li et al, 2002). Man könnte nun spekulieren, dass die Lysin-Hydroxylierung im U2AF65 eventuell Bindestelle oder Hinderungsgrund für andere Lysin-Modifikationen sein könnte. Dagegen spricht allerdings, dass im endogenen U2AF65 bei MS/MS-Analysen keine anderen posttranslationalen Modifikationen an K15 und K276 gefunden werden konnten.

Eine weitere mögliche funktionelle Erklärung wäre eine sterische Veränderung am U2AF65 und eine damit einhergehende (De-)Stabilisierung von Interaktionen, wie es bei der HIF α Asparagin-Hydroxylierung durch FIH (siehe 1.5.2) der Fall ist.

3.1.2 “U2 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN AUXILIARY FACTOR” (U2AF65)

Der “U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor” (U2AF) ist ein essentieller, heterodimerer Spleißfaktor aus einer 65 kD (U2AF65) und einer 35 kD (U2AF35) Untereinheit. Die große Untereinheit (U2AF65) bindet den “polypyrimidin tract” direkt “upstream” der “3´-splice-site” und ermöglicht dadurch die Anlagerung des U2 snRNPs an den “branch point” (Zamore PD et al, 1992).

U2AF65 besitzt eine N-terminale Arginin/Serin-reiche Domäne (RS-Domäne), zwei klassische RNA-Bindedomänen (“RNA recognition motif”, RRM) und ein C-terminales “U2AF homology motif” (UHM). Die RS-Domäne im U2AF65 ist notwendig für die Erkennung des “branch points” im pre-mRNA-Intron und die Rekrutierung des U2 snRNPs (Zamore PD et al, 1992; Valcarcel J et al, 1996). RRM1 und RRM2 im U2AF65 sind essentiell für die Bindung an den “polypyrimidin tract” der pre-mRNA (Zamore PD et al, 1992). Eine für das Spleißen notwendige Interaktion mit dem Spleißfaktor SF1 findet über die UHM-Domäne des U2AF65 statt (Selenko P et al, 2003). Die Bildung des Heterodimers mit U2AF35 ist gewährleistet über einen Tryptophanrest und eine Prolin-reiche Sequenz zwischen Aminosäure 85 und 112 des humanen U2AF65 (Kielkopf CL et al, 2001). Eine schematische Darstellung des RNA-Protein-Komplexes am “polypyrimidin tract” liefert die Abb. 54.

Versucht man die identifizierten Hydroxy-Lysine in die U2AF65-Domänenstruktur einzuordnen, so

sitzt Lys15 in keiner bislang bekannten funktionellen Domäne, wohingegen Lys276 Teil der α -Helix α_1 des RRM2 ist. Die RRM Domäne besitzt eine charakteristische Tertiärstruktur, die durch die Anordnung von vier β -Faltblättern und zwei α -Helices definiert ist ($\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$). Die basischen und aromatischen Aminosäuren der β -Faltblätter treten dabei in direkten Kontakt zur pre-mRNA (siehe Abb. 55 & 56). Man könnte sich nun vorstellen, dass die sterische Veränderung durch die Hydroxylierung am Lysin in der α -Helix Einfluss auf die RRM2-Struktur hat, und dadurch die RNA-Bindung beeinflusst werden könnte. Dass die Hydroxylierung in einer α -Helix gravierenden Einfluss haben kann, zeigt sich bei der Asparagin-Hydroxylase FIH. FIH verhindert durch die Hydroxylierung von Asn803 in der α -Helix α_A des Hypoxia-Inducible-Factor 1 (HIF-1) die Interaktion von HIF-1 mit dem Protein p300 (Freedman SJ et al, 2002).

Sequenzvergleiche der U2AF65-Homologen von Hefe bis Mensch zeigen, dass der Sequenzabschnitt um K276 (α -Helix des RRM2) sehr gut konserviert ist und K276 in allen Spezies vorhanden ist. Der Sequenzabschnitt um K15 ist dagegen weniger gut konserviert und K15 fehlt in *Drosophila* und *C. elegans* (siehe Abb. 57).

Die tatsächliche Funktion der neuentdeckten Lysin Hydroxylierung am U2AF65 ist noch unbekannt. Die MS-Daten haben gezeigt, dass nur ein kleiner Teil des endogenen U2AF65-„Pools“ hydroxyliert ist, bei K15 etwa 1%, bei K276 etwa 0,4% aller U2AF65-Moleküle. Die Häufigkeit, mit der posttranslationale Modifikationen an bestimmten Aminosäureresten endogener Proteine auftreten, kann

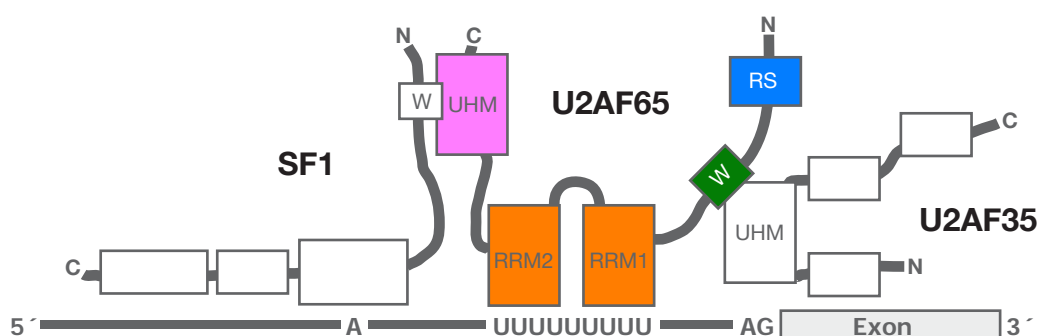


Abb. 54 | Schematische Darstellung der U2AF65-Domänenstruktur: U2AF65 bindet über die beiden RNA-Bindedomänen (RRM1, RRM2) an den „polypyrimidin tract“ in der pre-mRNA. Das „U2AF homology motif“ (UHM) gewährleistet die Interaktion mit dem Spleißfaktor SF1. Die Bildung des Heterodimers aus U2AF65 und U2AF35 geschieht über einen Tryptophanrest (W) und eine Prolin-reiche Sequenz am N-Terminus des U2AF65. Die RS-Domäne ermöglicht die Interaktion an weitere Spleiß-regulatorische Proteine.

sehr variabel sein, und liegt zwischen 100% und weniger als 1%. Versuche, die verschiedenen Phosphorylierungen (Serin) am humanen α -Casein massenspektrometrisch zu quantifizieren, zeigte in allen Fällen mehr als 10% der endogenen Proteine modifiziert (Kjeldsen F et al, 2007). Dagegen

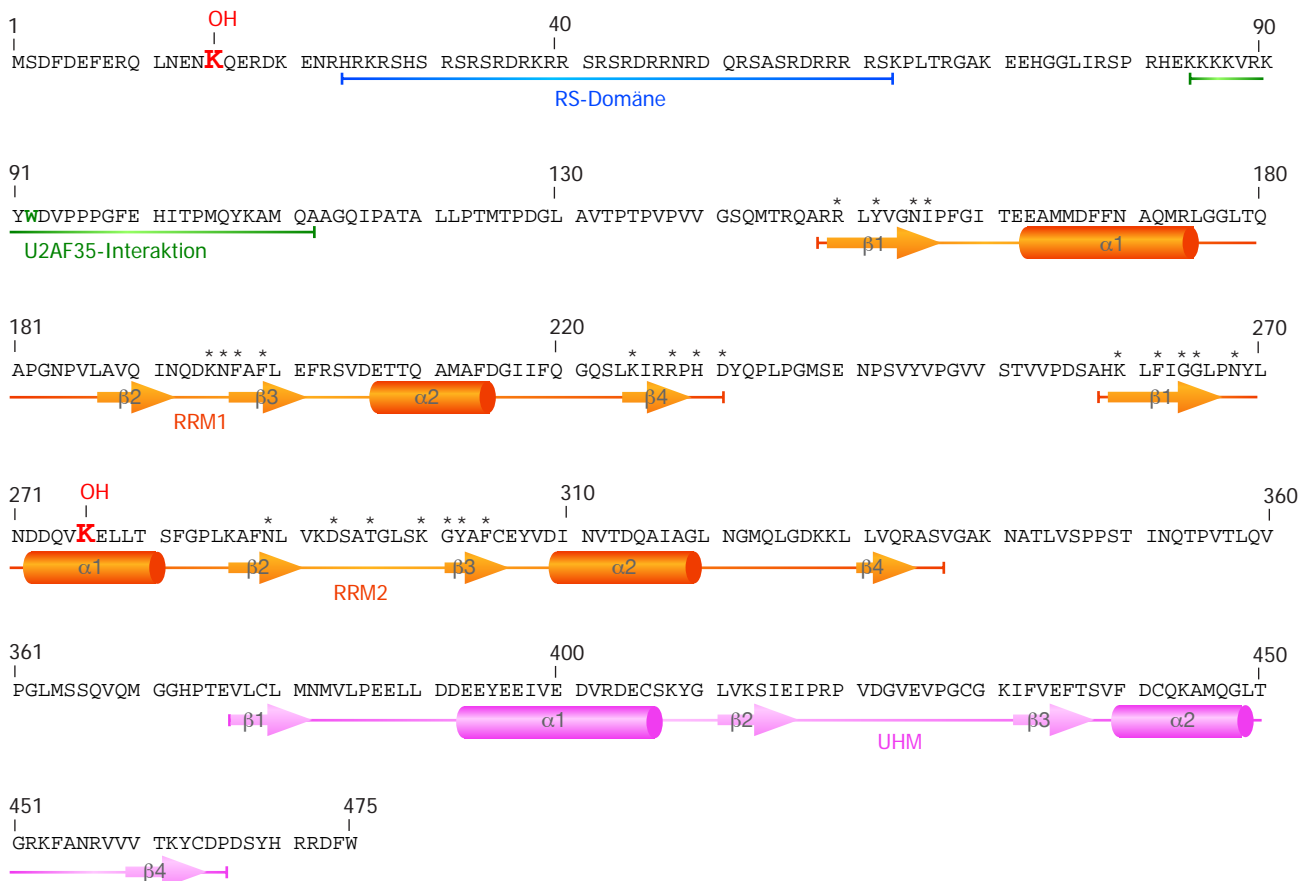


Abb. 55 | Peptidsequenz und Domänenstruktur des humanen U2AF65: Durch umfangreiche Strukturanalysen sind die Interaktionen des U2AF65 mit anderen Proteinen und mit der pre-mRNA teilweise sehr gut untersucht:

RS-Domäne (blau): Die positiv geladene Arginin/Serin-reiche Domäne interagiert mit der pre-mRNA um den "branch point" und rekrutiert dadurch das U2 snRNP (Valcarcel J et al, 1996).

Aminosäure 85 - 112 (grün): Entspricht dem minimalen Sequenzabschnitt der essentiell für die Heterodimerisierung mit U2AF35 ist. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Tryptophan W92 und das folgenden Prolin-Triplett (Kielkopf CL et al, 2001).

RRM1/2 ("RNA recognition motif"; orange): Die klassische RRM-Domäne ist ca. 90 Aminosäuren lang und charakterisiert durch zwei Ribonucleoprotein-Konsensussequenzen (RNP1 & RNP2) aus aromatischen und basischen Aminosäuren, die den direkten Kontakt zur Einzelstrang-RNA herstellen. Die typischen Sekundärstrukturelemente sind vier β -Faltblätter und zwei α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$). Aminosäurereste, die direkten Kontakt mit der pre-mRNA haben sind mit einem Stern markiert (Clery A et al, 2008; Sickmier EA et al, 2006).

UHM ("U2AF homology motif"; rosa): Die UHM Domäne ist eine nicht-klassische RRM Domäne mit ähnlicher Sekundärstruktur und verantwortlich für die Protein-Interaktionen von U2AF65 mit z.B. SF1 (Selenko P et al, 2003).

Hydroxy-Lysine K15 und K276 (rot): Für den Bereich um Lys15 ist bisher keine funktionelle Domäne bekannt. Lys276 ist Teil der α -Helix α_1 des RRM2.

sind einige Methylierungen an Histonen nur mit einer Häufigkeit von weniger als 1% zu beobachten (persönliche Kommunikation mit Matthias Mann, MPI für Biochemie; unveröffentlicht).

Für die beobachteten Verhältnisse im U2AF65 könnte es verschiedene Erklärungen geben. Die Hydroxylierung könnte eine Markierung für z.B. den Abbau des U2AF65 über das Proteasom sein, wie es schon von der Prolin-Hydroxylierung des HIF-1 α bekannt ist. Hier verstärkt die Hydroxylierung

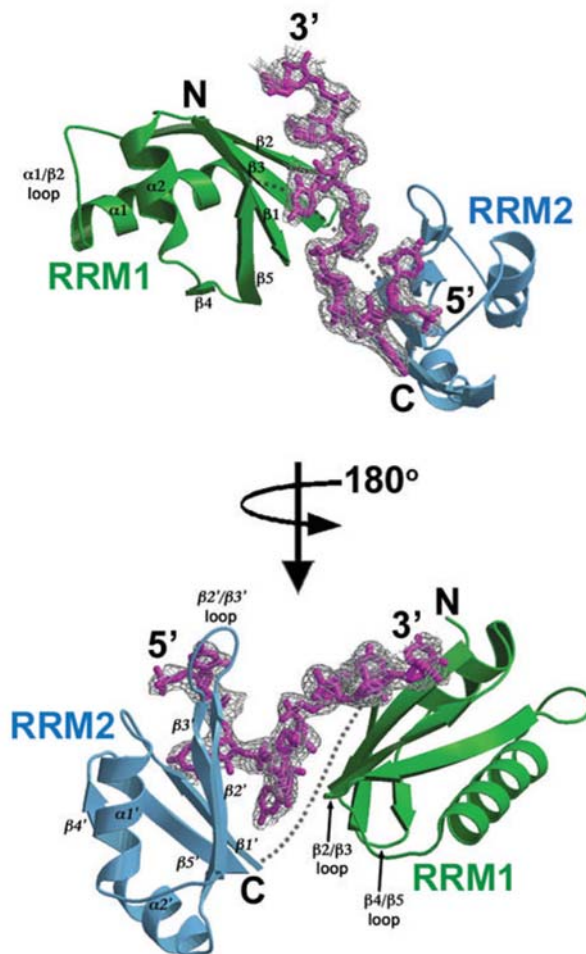


Abb. 56 | Struktur der RNA-Bindedomänen (RRM1 & RRM2) des humanen U2AF65: U2AF65 bindet über basische und aromatische Aminosäuren in seinen RNA-Bindedomänen RRM1 und RRM2 an den "polypyrimidin tract" der pre-mRNA. Struktur der RRM1 und RRM2 mit RNA (Sickmier EA et al, 2006). Das hydroxylierte Lys276 liegt in der α -Helix α_1 der RRM2, und tritt damit nicht in direkten Kontakt mit der RNA.

	K15	K276
	§ § § § §	§ § § § § * * * §
Mensch	FERQLNEN-- K QER	NDDQ V KELLT
Maus	FERQLNEN-- K QER	NDDQ V KELLT
Drosophila	-----RER	NDDQ V KELL
C. elegans	IERQFLDV--AQRE	TEDQ V KELLC
S. cerevisiae	LRSKIMESIG K SEK	EDYRM K ELFS

Abb. 57 | Sequenzalignment von U2AF65-Proteinen aus verschiedenen Spezies: Der Bereich um Lys15 (K15) im U2AF65 ist im Vergleich zum Lys276 (K276) weniger gut konserviert. K15 ist in Drosophila und C. elegans nicht vorhanden, wohingegen K276 von Mensch bis Hefe konserviert ist. § = ähnliche Aminosäuren; * = identische Aminosäuren

bestimmter Prolinreste die Interaktion des HIF-1 α zum von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor (pVHL). pVHL ist Teil eines Ubiquitin-E3-Ligase Komplexes, der hydroxyliertes HIF-1 α zum Abbau im Proteasom markiert (Jaakkola P et al, 2001). Alternativ könnte die Hydroxylierung auch eine Markierung für spezifische, nur unter bestimmten Bedingungen auftretende, Interaktionen mit anderen Proteinen sein, die dann eine veränderte Funktionalität oder Lokalisation des hydroxylierten U2AF65 zur Folge haben. Eine Überexpression von Jmjd6 in HeLa-Zellen hatte aber keinen sichtbaren Einfluss auf die Verteilung des endogenen U2AF65 (siehe Abb. 44).

3.1.3 AUTO-HYDROXYLIERUNG DES JMJD6

Die Lysin-Hydroxylase-Aktivität des Jmjd6 bestätigte sich auch an rekombinantem Jmjd6-Protein. Nach Inkubation mit Fe(II), Sauerstoff und 2-OG wurden hydroxylierte Lysine an Position K111 und K167 in der Jmjd6-Sequenz festgestellt. Die K167-Hydroxylierung konnte auch an endogenem Jmjd6 nachgewiesen werden. Für andere Mitglieder der Fe(II)-2-OG-Dioxygenasen konnte die Auto-Hydroxylierung in Abwesenheit des eigentlichen Substrats schon gezeigt werden. In allen Fällen traf es aromatische Aminosäuren in unmittelbarer Nähe (< 10 Angström) zum aktiven Zentrum, so dass man vermutete, es könnte ein negativer "Feedback"-Mechanismus sein (Chen YH et al, 2008). FIH, z.B. hydroxyliert sich an einem Tryptophan im aktiven Zentrum bei Abwesenheit des Substrats HIF (Chen YH et al, 2008). Die Dioxygenasen TauD und TfdA hydroxylieren ein internes Tyrosin (Ryle MJ et al, 2003), bzw. Tryptophan (Liu A et al, 2001).

Bei Jmjd6 ist es anders. Erstens tritt die Auto-Hydroxylierung auch bei Anwesenheit des eigentlichen Substrats auf (persönliche Kommunikation, Christopher Schofield, Oxford). Zweitens trifft es keine aromatischen Aminosäuren. Drittens liegen die Lysinreste K111 und K167 nach Strukturvorhersagen nicht in der Nähe des aktiven Zentrums. Die betroffenen Lysine sind allerdings in verschiedenen Species sehr gut konserviert (siehe Abb. 58). Um Vorhersagen über den genauen Vorgang der Auto-Hydroxylierung zu treffen, sind Kristallstrukturanalysen essentiell. Bisher ist es daher noch nicht möglich, etwas über die Funktion dieser neuartigen Auto-Hydroxylierung bei Fe(II)-2-OG-Dioxygenasen zu sagen.

3.1.4 JMJD6 HAT HISTONE-ARGININ-DEMETHYLASE AKTIVITÄT?

Chang et al haben 2007 für Jmjd6 eine Arginin-Demethylase-Aktivität für die Histone H3 und H4 nachgewiesen (Chang B et al, 2007). Dafür inkubierten sie methylierte Histonpeptide mit Fe(II), 2-OG, Sauerstoff, Ascorbat und mit rekombinantem Jmjd6 bzw. (als Kontrolle) ohne rekombinantes Jmjd6. Veränderungen wiesen sie im Western Blot mit Antikörpern gegen spezifische Histonmodifikationen nach. Das Signal mit anti-H3R2me2 (dimethyliertes Arg2 in Histon H3) und anti-H4R3me2-Antikörper wurde mit Jmjd6 schwächer im Vergleich zum Kontrollansatz. Andere Modifikationen, wie etwa H3K4me3 oder H3K9me2 blieben unverändert. Eine Jmjd6-Mutante mit verändertem Fe(II) Bindemotiv (H187A, D189A, H273A) hatte keinen Einfluss mehr auf H3R2me2 und H4R3me2.

Mit Hilfe von MALDI-TOF MS-Analysen an dimethylierten Histonpeptiden (p2meR3H4 & p2meR2H3) zeigten Chang et al die Entstehung des monomethylierten Peptides nach Inkubation mit Jmjd6, aber nicht mit der Mutante bzw. ohne Jmjd6. Interessanterweise trat dabei auch eine Lysin-Hydroxylierung am Histonpeptid auf, die aber von den Autoren nicht näher kommentiert wurde.

Um die Demethylierung in-vivo nachzuweisen, wurden die anti-H3R2me2- und anti-H4R3me2-Antikörper auch in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Nach Überexpression von Wildtyp-Jmjd6 mit "V5-tag" reduzierte sich das H3R2me2 und H4R3me2 Signal in HeLa-Zellen. Eine Jmjd6-Mutante mit verändertem Fe(II) Bindemotiv (H187A) hatte keinen Einfluss.

Die von Chang et al prognostizierte Histon-Arginin Demethylaseaktivität steht im Widerspruch zu der in dieser Arbeit identifizierten U2AF65-Lysin-Hydroxylaseaktivität des Jmjd6-Proteins. Die beobachtete Jmjd6-Kernverteilung im Interchromatinraum (siehe 2.1.1) spricht ebensowenig für



Abb. 58 | Jmjd6-Sequenzalignment: Lys111 (K111) liegt ausserhalb der JmJC-Domäne in keinem bekannten Sequenzmotiv. Laut Sekundärstrukturvorhersagen (www.predictprotein.org) für Jmjd6 liegt K111 in einem "Loop" vor einer α -Helix (Aminosäure 114-122). Lys167 befindet sich am Beginn der JmJC-Domäne in einem Kernlokalisationssignal (NLS). Beide Lysine sind von Hydra bis Mensch sehr gut konserviert. Bei *C. elegans* gab es einen Austausch K111R, und bei *Drosophila* einen Austausch K167N.

eine enzymatische Aktivität an Histonen, wie die identifizierten Interaktionspartner des Jmjd6 (siehe 2.2.1). Im Laufe dieser Promotion war es auch nicht möglich, die Demethylaseaktivität des Jmjd6 zu bestätigen. Der Versuch, die Demethylierung von Histonpeptiden, wie bei Chang et al beschrieben, zu wiederholen, gelang nicht. Es konnte keine Demethylierung beobachtet werden, eine Lysin-Hydroxylierung an den Histonpeptiden dagegen schon (Persönliche Kommunikation mit Christopher Schofield, Oxford). Diese in-vitro-Hydroxylierung an Histonpeptiden konnte aber nicht in-vivo bestätigt werden. Eine aktuell im Labor von Matthias Mann (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführte grundlegende MS-Analyse von posttranslationalen Modifikationen an Histonen, zeigte keine Lysin-Hydroxylierung an endogenen Histonen (unveröffentlicht; persönliche Kommunikation mit Matthias Mann, Martinsried). Dagegen konnte die Lysin-Hydroxylierung an U2AF65 auch am endogenen Protein gezeigt werden (siehe 2.4.2).

Die Hydroxylierung der Histonpeptide lässt sich mit der Beobachtung erklären, dass Jmjd6 im "in-vitro-Assay" eine Vorliebe für besonders basische Peptide mit einer Ladung von mindestens +4 aufwies (Webby C et al, 2009). Dies war auch bei den Histonpeptiden der Fall und muss nicht die in-vivo Begebenheiten widerspiegeln.

Prinzipiell ist es möglich, dass ein Protein mehrere enzymatische Aktivitäten hat. Die Kollagen-Lysyl-Hydroxylase 1 (LH-1) hat neben der Hydroxylase-Aktivität, eine Galactosyltransferase- und eine Glucosyltransferase-Aktivität, die sie sequentiell einsetzt. Dadurch werden spezifische Lysinreste im Kollagen nach der Hydroxylierung vom gleichen Protein auch noch glykosyliert (Myllylä R et al, 2007). Dass Jmjd6 eine Lysyl-Hydroxylaseaktivität und eine Arginin-Demethylaseaktivität besitzt, konnte in dieser Arbeit aber nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigen die Ergebnisse, dass die Lysin-Hydroxylierung die primäre Funktion des Jmjd6-Proteins ist.

3.2 JMJD6 BEEINFLUSST DEN SPLEIßPROZESS

Jmjd6 hydroxyliert bestimmte Lysine des Spleißfaktors U2AF65, der ein essentieller Teil des konstitutiven und alternativen Spleißprozesses ist. Inwieweit diese spezifischen Hydroxylierungen die Aufgaben des U2AF65 beim Spleißen beeinflussen, ist noch nicht geklärt. Aber in einem "double-re-

porter-splicing-assay" konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Jmjd6 den konstitutiven Spleißprozess hemmt (siehe 2.5.1). Versuche mit einem α -Tropomyosin Minigen-Konstrukt konnten einen Einfluss von Jmjd6 auch auf das alternative Spleißen aufzeigen. Der "knockdown" von Jmjd6 führte zum deutlichen Anstieg im "Exon-skipping" dieses Reportergens (Webby C et al, 2009).

3.2.1 "DOUBLE-REPORTER-SPLICING-ASSAY"

Jmjd6 Überexpression

Nach Überexpression von Jmjd6 in HeLa-Zellen sank die Spleißaktivität im "double-reporter-splicing-assay" auf knapp 50%, wohingegen in der Kontrolle ("mock"-Transfektion) kein Effekt zu beobachten war. Die ASM2-Jmjd6-Mutante mit verändertem Fe(II)-Bindemotiv (H187A und D189A) zeigte einen ähnlichen Effekt wie Wildtyp-Jmjd6, obwohl diese Mutante in den in-vitro-Assays keine Oxygenaseaktivität mehr hatte (Webby C et al, 2009). Dies könnte man als Indiz dafür werten, dass die Oxygenaseaktivität nicht ausschlaggebend für die Spleißhemmung ist. Was wiederum bedeuten würde, es gäbe noch eine zweite, bisher unbekannte Aktivität des Jmjd6. Eine weitere mögliche Erklärung, wäre die Multimerisierung des Jmjd6 Proteins. Der "fluorescent-two-hybrid-assay" und MS-Analysen haben gezeigt, dass Jmjd6 stabile Homodimere bzw. -oligomere bildet. Die Dioxygenase FIH bildet ebenfalls Homodimere, die essentiell für die enzymatische Aktivität sind (Lancaster DE et al, 2004). Wäre also eine Di- oder Multimerisierung ausschlaggebend für die Aktivität des Jmjd6, so interagiert im in-vitro-Assay ausschließlich mutiertes rekombinantes Jmjd6. Bei der Überexpression in Zellen dagegen vermischt sich der "Pool" aus endogenem Wildtyp- und überexprimiertem mutiertem Jmjd6. Und eventuell hebt ein Wildtyp-Molekül die Hemmung des mutierten Jmjd6 im Dimer/Oligomer auf. Dadurch wäre in-vivo nur ein schwacher bis kein Effekt der verhinderten Enzymaktivität in der ASM2-Jmjd6 Mutante zu erkennen.

Jmjd6 "knock-down"

Mithilfe von siRNAs wurde Jmjd6 auf 5-10% des endogenen Niveaus herunterreguliert. Dieser "knock-down" hatte einen Anstieg von 20-30% der Spleißaktivität im "double-reporter-splicing-assay" zur Folge. Die Kontroll-siRNA hatte keinen Einfluss. Somit zeigte die Herunterregulation der Jmjd6-Aktivität einen gegenläufigen Effekt zur Überexpression.

3.2.2 WEITERE JMJD6 INTERAKTIONSPARTNER

In einem "TAP-tag-Screen" konnten 78 Proteine identifiziert werden, die potentielle Interaktionspartner des Jmjd6-Proteins sind. Nach Ausschluss der potentiellen Falsch-positiven Proteine blieben 34 Proteine übrig. Die Hälfte der verbliebenen Proteine (17 aus 34) gehören zur pre-mRNA-Prozessierungsmaschinerie. Darunter befinden sich essentielle Spleißfaktoren/SR-Proteine (12), RNA-Helikasen der "Dead-box"-Proteinfamilie (4) und ein 3'-Prozessierungsfaktor. Drei der vier nukleolären Proteine sind Teil der rRNA-Prozessierungsmaschinerie. Desweiteren wurden fünf Transkriptions-assoziierte Proteine und zwei DNA-bindende Proteine gefunden. Die Casein Kinase 2A1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die, abhängig vom Zelltyp, sowohl im Cytoplasma als auch im Kern vorkommen kann (Faust & Montenarh, 2000). Die Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type II beta (PIPkin IIbeta) ist der bisher einzige nukleäre Vertreter der Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase Familie, die durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-5-Phosphat Phosphatidylinositol-5,4-Bisphosphat bildet (Richardson JP et al, 2007). Vier der potentiellen Jmjd6-Interaktionspartner wurde bisher noch keine Funktion zugeordnet (siehe Abb. 17).

Das Repertoire an potentiellen Jmjd6 Interaktionspartnern legt eine mögliche Rolle in der RNA-Prozessierung nahe, was gut mit den Ergebnissen aus dem "double-reporter-splicing-assay" und den Kernlokalisationsstudien korreliert. Die Interaktion mit den Spleißfaktoren U2AF65, hLuc7A und hLuc7B1 konnte auch in weiteren Co-Immunopräzipitationen bestätigt werden (siehe 2.2.3). Es handelt sich wahrscheinlich um recht transiente Wechselwirkungen, da trotz Präzipitation großer Mengen Jmjd6 im "TAP-tag-Assay" keine Interaktionspartner in der Menge kopräzipitiert wurden, dass sie nach Coomassiefärbung im Polyacrylamidgel eine sichtbare Bande ergaben. Einen weiteren Hinweis lieferten FRAP-Versuche ("fluorescence-recovery-after-photobleaching") mit Jmjd6-GFP (Diplomarbeit Corinna Schmitz, unveröffentlicht). Hier war zu beobachten, dass bereits eine Sekunde nach Bleichung die Ausgangsfluoreszenz bei Jmjd6-GFP wieder hergestellt war. Dies führte zu der Annahme, dass der Großteil des Jmjd6-Fusionsproteins sehr mobil im Kern vorliegt und nicht an immobile Strukturen bindet (Diplomarbeit Corinna Schmitz). Dies unterstützt die These, dass Jmjd6 unter den beobachteten Bedingungen nur sehr transiente Interaktionen eingeht.

3.2.3 JMJD6 UND SC35

Die partielle Kolokalisation von Jmjd6 mit SC35-Domänen ("Interchromatin Granule Cluster") im Interchromatinraum des Zellkerns (siehe 2.1.2) unterstützt die bisherigen Ergebnisse. Ähnlich den Resultaten aus den Ko-Immunpräzipitationen und dem "double-reporter-splicing-assay" weist auch die Verteilung von Jmjd6 im Interchromatinraum des Kerns auf eine Aufgabe bei der pre-mRNA-Prozessierung hin. Die massenspektrometrische Analyse des "Interchromatin Granule Cluster" (IGC)-Proteoms aus Mauszellen hat gezeigt, dass 81% der identifizierten Proteine eine Rolle in der pre-mRNA-Prozessierung spielen, dabei sind 54% am pre-mRNA-Spleißprozess beteiligt (Saitoh N et al, 2004). Die Proteine sind in steter Bewegung und wechseln häufig zwischen SC35-Domänen und dem Nukleoplasma hin und her (Misteli T, 2000). Poly(A)-RNA findet man im gesamten Nukleoplasma, sie ist aber ebenfalls in den SC35-Domänen stark angereichert (Hall LL et al, 2006).

Durch die Überexpression von Jmjd6 zeigte sich eine starke Umstrukturierung der SC35-Domänen. Die Domänen lösten sich auf und es ergab sich ein schwächeres, punktuelltes Muster im Nukleoplasma (siehe 2.5.2). Ein ähnlicher Effekt wurde bisher bei Behandlung von Zellen mit dem Phosphatase Inhibitor Tautomycin (inhibiert PP1) beobachtet (Hall LL et al, 2006). Die Überexpression von Clk/Sty-Kinase, bzw. der Kinasen SRPK1 und SRPK2 hatte ähnliche Folgen. Die Kinasen phosphorylieren RS-Domänen in SR-Proteinen (Gui JF et al, 1994; Colwill K et al, 1996; Kuroyanagi N et al, 1998). Für SRPK1 wurde neben der Umverteilung des SC35 auch eine hemmende Wirkung auf den Spleißprozess in-vitro festgestellt. Eine β -Globin pre-mRNA wurde im in-vitro "spliceassay" mit rekombinanter SRPK1 weniger gut gespleißt als ohne (Gui JF et al, 1994).

In der Umverteilung von SC35 in Gegenwart von Jmjd6 könnte eventuell der Grund für die Hemmung des konstitutiven Spleißprozesses gesucht werden. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von RS-Domänen haben Einfluss auf Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Interaktionen von Spleißfaktoren. Inwieweit ähnliche Effekte auch durch die Lysin-Hydroxylierung durch Jmjd6 an Spleißfaktoren gegeben sind, ist noch unklar. Auch muss noch geklärt werden, ob diese dann verantwortlich sind für das Auflösen der SC35-Domänen und die beobachteten Effekte auf den Spleißprozess.

Wie auch beim "double-reporter-splicing-assay" war beim Effekt auf SC35 die ASM2-Mutante genauso aktiv wie das Wildtyp-Jmjd6. Der "knockdown" des endogenen Jmjd6 hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Verteilung des SC35-Proteins in HeLa-Zellen.

3.3 JMJD6 INTERAKTIONSTUDIEN

3.3.1 JMJD6 BILDET HOMO-DIMERE UND -OLIGOMERE

Der Western Blot mit anti-Jmjd6 Antikörper nach Immunpräzipitation des endogenen Jmjd6 aus HeLa-Zellen zeigte, dass Jmjd6 stabile Homodimere und Oligomere bildet (siehe Abb. 23). Die Daten aus dem "fluorescence-two-hybrid-assay" bestätigten dies, und der essentielle Jmjd6-Sequenzabschnitt konnte auf die Aminosäuren 25-48 reduziert werden (siehe 2.3.3). Bei der verwandten Dioxygenase FIH ist die Homodimerisierung Voraussetzung für die katalytische Aktivität. Eine einzelne Punktmutation (L340R) verhindert die Homodimerisierung nahezu komplett. Anders als bei Jmjd6 liegt die Homodimerisierungsdomäne des FIH in einer α -Helix am C-terminalen Ende (Lancaster DE et al, 2004). Weitere Mutationsanalysen sind notwendig, um einzelne essentielle Aminosäuren für die Homodimerisierung des Jmjd6 zu identifizieren.

Eine Multimerisierung des Jmjd6-Proteins wurde bereits von Tibrewal N et al publiziert. Nach Überexpression und Immunopräzipitation eines "HA-getaggten" Jmjd6 mit einem anti-HA Antikörper wurden stabile Jmjd6 Banden bei ca. 50 kD, 100 kD und 150 kD identifiziert. Diese Multimere konnten mit rekombinantem Jmjd6 aus E.coli nicht gezeigt werden (Tibrewal N et al, 2007). In wie weit eine Jmjd6-Homomultimerisierung Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat ist noch unklar. Die beobachteten Lysin-Hydroxylierungen in "in-vitro-Assays" mit rekombinantem Jmjd6 (Webby C et al, 2009; Chang B et al, 2007) sprechen dafür, dass rekombinantes Jmjd6 enzymatisch aktiv ist. Entweder die Oligomerisierung spielt dabei keine Rolle (Tibrewal N et al, 2007) oder rekombinantes Jmjd6 ist doch in der Lage zu oligomerisieren (Diplomarbeit Astrid Heim, unveröffentlicht).

3.3.2 INTERAKTION MIT U2AF65

Mit Hilfe des "GFP-Pulldown-Assays" konnte gezeigt werden, dass sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus für eine Interaktion von Jmjd6 mit U2AF65 notwendig sind (siehe 2.3.4). Es ist möglich, dass der N-Terminus für die U2AF65-Bindung deshalb gebraucht wird, weil die Interaktion nur mit dem Jmjd6-Oligomer erfolgt. Dann wäre die eigentliche Interaktionsstelle zwischen Jmjd6 und U2AF65 am C-Terminus zwischen Aminosäure 363 und 380. In diesem Bereich der Jmjd6-Sequenz liegt neben dem Kernlokalisierungssignal (NLS) kein bekanntes Sequenzmotiv (siehe Abb. 02).

Für detailliertere Aussagen über diese Interaktion bedarf es weiterer Mutationsanalysen und im besten Fall Strukturanalysen der beiden Proteine in Verbindung.

3.4 JMJD6 IM NUKLEOLUS

Die Überexpression von Jmjd6-GFP hat gezeigt, dass es neben dem Jmjd6 im Interchromatinraum des Zellkerns auch eine Fraktion nukleoläres Jmjd6 gibt. Die Menge an nukleolärem Jmjd6 stieg dramatisch an, bei Deletion des Serin-reichen Sequenzabschnitts zwischen Aminosäure 338 und 363 (siehe 2.3.2). Über die Funktion Serin-reicher Abschnitte in Proteinen ist wenig bekannt. Eines der seltenen Proteine mit einem ähnlichen Sequenzmotiv, ist RNPS1 (Mayeda A et al, 1999). RNPS1 ist Teil des "Exon-Exon-Junction Complex", wirkt als Spleißaktivator in-vitro und reguliert alternatives Spleißen in-vivo (Mayeda A et al, 1999; Le Hir H et al, 2000). Ergebnisse zur Funktion der Poly-Serine in RNPS1 gibt es bisher nicht.

Die primäre Funktion des Nukleolus ist die Ribosomenbiogenese. Mittlerweile konnte ihm aber auch eine Rolle in der Regulation von Zellproliferation, Zellzyklus und Stressantwort der Zelle nachgewiesen werden (Boisvert FM et al, 2007; Stark & Taliansky, 2009). Nukleolärer Protein-Import und -Export, bzw. die dafür notwendigen Signalsequenzen (NoLS) sind bisher nur wenig charakterisiert. Bekannte Importsignalsequenzen sind zwischen 7 und 30 Aminosäuren lang und setzen sich aus Arg und Lys zusammen (Emmott & Hiscox, 2009). In manchen Fällen, wie etwa bei FGF2 wirken Kern-lokalisierungssignale (NLS) auch als NoLS (Sheng Z et al, 2004). Oftmals wirken Proteine mit NoLS auch als Bindestelle für Proteine ohne NoLS und lotsen sie so in den Nukleolus. Alternativ können Proteine auch über die RNA-Bindedomäne für spezifische rDNA in den Nukleolus gelangen (Emmott & Hiscox, 2009).

Der Sequenzabschnitt 338-363 des Jmjd6 enthält kein bisher bekanntes nukleoläres Import- oder Exportsignal. Inwieweit also die Poly-Serin Sequenz eine Rolle bei der nukleolären Lokalisation von Jmjd6 spielt, gilt es noch zu klären. Auch über die Funktion des Jmjd6 im Nukleolus kann man keine Aussage treffen. Der einzige Hinweis ist das Verschwinden eines UBF-Signals im Nukleolus, wenn Jmjd6 überexprimiert wird. Mögliche Ansätze könnten die vier nukleolären potentiellen Jmjd6-Inter-

aktionspartner aus dem "TAP-tag-Screen" liefern (siehe Abb. 17), oder die Lokalisation der $\Delta 338$ -403 Jmjd6-Mutante ausschließlich im Fibrillar Centre des Nucleolus (siehe 2.6.1).

4. AUSBLICK

Die Fe(II)-2-OG-Dioxygenase Jmjd6 ist eine Lysin-Hydroxylase, die Lysine in Spleiß-assoziierten Proteinen am C5-Atom hydroxyliert. Das konstitutive und auch das alternative Spleißen wird von Jmjd6 beeinflusst. Der molekulare Zusammenhang zwischen der Hydroxylierungsaktivität von Jmjd6 und seinem Effekt auf den Spleißprozess ist noch unklar.

Um verstehen zu können, wie detailliert auf molekularer Ebene die Hydroxylierung von U2AF65 eventuell den Spleißprozess beeinflusst, bedarf es weiterer Experimente. Hilfreich könnten hier in Zukunft Strukturanalysen von Jmjd6, bzw. der Interaktion von Jmjd6 und U2AF65 sein. Untersuchungen der Aktivität von U2AF65-Mutanten, die am K15 und K276 mutiert sind, in Spleiß-"Assay"-Experimenten wären eine weitere Möglichkeit, die biologische Signifikanz dieser Modifikation zu verstehen.

Es ist möglich, dass Jmjd6 ähnlich dem FIH als Sauerstoffsensor der Zelle fungiert. Mit Hilfe der SILAC-("stable-isotopic labelling by amino acids in cell culture") Methode (Mann M, 2006) wäre es möglich die Quantität der U2AF65-Lysin-Hydroxylierungen unter verschiedensten Bedingungen zu vergleichen (z.B. Hypoxie).

Es stellt sich ausserdem die Frage, ob U2AF65 der einzige Spleißfaktor ist, der von Jmjd6 in vivo an Lysinen hydroxyliert wird. Eine Antwort könnte man mit detaillierten massenspektrometrischen Analysen isolierter Spleißosomen bekommen. Nach Isolierung ganzer Spleißosomkomplexe wurde die proteosomale Zusammensetzung bereits per MS-Analyse untersucht (Rappsilber J et al, 2002). Basierend auf diesem Ansatz könnte man spezifisch nach Hydroxy-Lysinen in Proteinen des Spleißosoms suchen.

Bei etwa 70% der menschlichen Gene können durch alternatives Spleißen mehrere verschiedene Genprodukte entstehen (Wang & Cooper, 2007). Mit Hilfe von "whole genome scale exon arrays" lässt sich das Transkriptom einer Zellpopulation abbilden. Dabei können sowohl die Transkriptionsniveaus einzelner mRNAs, als auch die alternativen Spleißprodukte detektiert werden. Somit wäre es möglich sämtliche Transkripte von Zellpopulationen mit Jmjd6-Überexpression bzw. Jmjd6-"knock-down" mit Kontrollpopulationen zu vergleichen. Eventuelle Einflüsse von Jmjd6 auf alternatives Spleißen ließen

sich dadurch erkennen. Jmjd6 “Knock-out” Mäuse haben schwerste Entwicklungsdefekte in verschiedensten Organen und sind nicht lebensfähig (siehe 1.2.1). Vielleicht lassen sich diese Defekte mit Fehlern im alternativen Spleißen erklären.

Diese Promotion konnte die enzymatische Aktivität des Jmjd6 Proteins aufklären und einen Einfluss auf den Spleißprozess feststellen. Sie ebnete damit den Weg für weiterführende Versuche, die die Funktionalität einer neuartigen posttranslationalen Modifikation genauer charakterisieren. Fehlerhaftes Spleißen ist in vielen Fällen Ursache von schwerwiegenden Krankheiten (Wang & Cooper, 2007). Die Entdeckung eines möglicherweise neuartigen Regulationsmechanismus durch posttranslationale Modifikationen an Spleißfaktoren, ermöglicht in Zukunft vielleicht das bessere Verständnis des komplexen Spleißprozesses.

5. MATERIAL

5.1 CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad Laboratories
Ammoniumacetat	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
BACTO Agar	DIFCO / Becton Dickinson Microbiology Systems
BACTO Peptone	DIFCO / Becton Dickinson Microbiology Systems
BACTO Yeast Extract	DIFCO / Becton Dickinson Microbiology Systems
Bovines Serumalbumine (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Cellulose (Fibrous Cellulose Powder)	Whatman BioSystems Ltd
Certistain Ponceau S	Merck
4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roche
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom AG
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Fluka Chemika
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Filmentwicklungslösung Roentoroll 25	TETENAL AG & Co KG
Filmfixierlösung Superfix 25	TETENAL AG & Co KG
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Formaldehyd	Carl Roth
α -D(+)-Glucose-Monohydrat	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
HEPES	Sigma
IgG Sepharose 6 fast flow	Amersham Biosciences
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumacetat	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Kanamycin	Serva Feinbiochemika
Leupeptin	Sigma

Chemikalien	Hersteller
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Carl Roth
Magermilchpulver Naturaflor	Töpfer GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth
2-Mercaptoethanol	Fluka Biochemika
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Nonidet P40	Fluka Biochemika
N-Oxalylglycin (NOG)	ALEXIS Biochemicals
Okadaische Säure, Natriumsalz	Calbiochem
Oktadecyl (C ₁₈)-Silika	3M
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma
Para-Hydroxycumarinsäure	Sigma
Pefabloc SC	Boehringer
Penicillin/Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom AG
PeqGOLD Universal Agarose	PeqLab
Pepstatin A	Sigma
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences
Protein G Sepharose 4 fast flow	Amersham Biosciences
D(+)-Saccharose	Carl Roth
SCX	3M
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
TO-PRO-3-Iodid	Molecular Probes
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth
Tris	Merck
Triton X-100	Carl Roth
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid	Fluka Chemika

5.2 MARKER

Marker	Hersteller
GeneRuler DNA ladder mix	MBI Fermentas
PeqGold Protein Marker IV	PeqLab

5.3 ENZYME

Enzyme	Hersteller
Restriktionsenzyme	<i>New England Biolabs</i>
RNAse A	<i>Qiagen</i>
shrimp alkaline phosphatase (SAP)	<i>usb</i>
AcTEV Protease	<i>Invitrogen</i>
T4 DNA-Ligase	<i>New England Biolabs</i>
Taq-DNA-Polymerase	<i>Peqlab</i>

5.4 TRANSFEKTIONSREAGENZIEREN

Transfektionsreagenz	Hersteller
Lipofectamin 2000	<i>Invitrogen</i>
Nanofectin I	<i>PAA Laboratories</i>
PEI (pH 7.0 oder pH 10.0)	<i>Labor Heinrich Leonhardt (LMU München)</i>

5.5 KITS

Kits	Hersteller
Novex Colloidal Blue Stain Kit	<i>Invitrogen</i>
Nucleobond AX 500 Kit	<i>Macherey-Nagel</i>
Nucleospin Extract II Kit	<i>Macherey-Nagel</i>
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	<i>Stratagene</i>
QIAGEN Plasmid Mega Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
Quickprep mRNA Purification Kit	<i>GE Healthcare</i>
First-Strand cDNA Synthesis Kit	<i>GE Healthcare</i>

5.6 MIKROSKOPE

Mikroskope	Hersteller
Leica TCS SP1 mit 100x/1,4 NA-PlanApochromat-Ölimmersionsobjektiv	<i>Leica Microsystems</i>
Nikon ECLIPSE TE2000-S mit Nikon PlanFluor 60x Ölimmersionsobjektiv	<i>Leica Microsystems</i>

5.7 ZELLEN

Zelllinie	
HEK 293T	<i>humane embryonale Nierenzellen, transformiert durch großes T-Antigen von SV40</i>
HeLa	<i>humane Cervixkarzinomzellen</i>
NIH3T3	<i>embryonale Mausfibroblasten</i>
BHK	<i>Hamster Nierenzellen</i>

5.8 ANTIKÖRPER

Erstantikörper	Quelle	Western Blot	Immunfluoreszenz	Hersteller
anti-Jmjd6 (ab10526)	Kaninchen (polyklonal)	1:500	1:500	<i>abcam</i>
anti-Jmjd6 (mAB328)	Maus (monoklonal)	kein Signal	1:200	<i>Labor Andreas Lengeling (University of Edinburgh)</i>
anti-Jmjd6 (H-7, sc-28348)	Maus (monoklonal)	1:200	1:200	<i>santa cruz</i>
anti-Jmjd6 (D-4, sc-28349)	Maus (monoklonal)	kein Signal	kein Signal	<i>santa cruz</i>
anti-Jmjd6 (N-20, sc-11632)	Ziege (polyklonal)	1:200	kein Signal	<i>santa cruz</i>
anti-Jmjd6 APSR-14.4, sc-32740)	Hamster (monoklonal)	kein Signal	kein Signal	<i>santa cruz</i>
anti-Y12 (ab3138)	Maus (monoklonal)	1:5000	1:350	<i>abcam</i>
anti-SC35 (ab11826)	Maus (monoklonal)	kein Signal	1:500	<i>abcam</i>
anti-CROP	Kaninchen (polyklonal)	1:5000	??	<i>Labor Kazumitsu Ueda (Kyoto University)</i>
anti-U2AF65 (U 4758)	Maus (monoklonal)	1:1000	1:1000	<i>Sigma</i>
anti-Luc7 like 1 (ab19127)	Huhn (polyklonal)	1:200	nicht getestet	<i>abcam</i>
anti-UBF (sc13125)	Maus (monoklonal)	1:500	1:500	<i>santa cruz</i>
anti-pescadillo	Ratte	nicht getestet	1:500	<i>Labor Dirk Eick (GSF, München)</i>
anti-fibrillarin (ab5821)	Kaninchen (polyklonal)	nicht getestet	1:500	<i>abcam</i>
anti-HistonH3-triMethylK4 (ab8580)	Kaninchen (polyklonal)	nicht getestet	1:250	<i>abcam</i>
anti-RNA-Pol II (MMS-129R)	Maus (monoklonal)	nicht getestet	1:50	<i>Covance</i>
anti-GFP (1181460001)	Maus (monoklonal)	1:1000	nicht getestet	<i>Roche</i>
anti-Tubulin YL	Maus (monoklonal)	unverdünnt	nicht getestet	<i>Labor Manfred Schliwa (LMU München)</i>
anti-TAP-tag (A00683)	Kanninchen (polyklonal)	nicht getestet	1:200	<i>Genscript</i>

Zweitantikörper	Quelle	Western Blot	Immunfluoreszenz	Hersteller
HRP anti-Ziege	Pferd	1:2000	-	<i>VECTOR</i>
HRP anti-Kaninchen	Ziege	1:2000	-	<i>VECTOR</i>
HRP anti-Maus	Schaf	1:2000	-	<i>Amersham</i>
HRP anti-Hamster	Ziege	1:2000	-	<i>santa cruz</i>
IRDye680 anti-Maus	Ziege	1:5000	-	<i>Rockland</i>
IRDye800 anti-Maus	Ziege	1:5000	-	<i>Rockland</i>
IRDye680 anti-Kaninchen	Ziege	1:5000	-	<i>Rockland</i>
IRDye800 anti-Kaninchen	Ziege	1:5000	-	<i>Rockland</i>
IRDye800 anti-Huhn	Ziege	1:5000	-	<i>Rockland</i>
FITC anti-Kaninchen	Ziege	-	1:160	<i>Sigma</i>
FITC anti-Maus	Schaf	-	1:500	<i>Roche</i>
FITC anti-Hamster	Ziege	-	1:400	<i>santa cruz</i>
Cy3 anti-Maus	Schaf	-	1:2000	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Cy3 anti-Kaninchen	Ziege	-	1:1000	<i>GE Healthcare</i>

5.9 PRIMER

Name	Gen	bindet an	Sequenz	Schnittstelle	Info
PSR_muta1	PSR (human)	Nuk. 1071-1117	CGA CTC AGA GTG CGA GTC TGG CTC CGA GGG CGA TGG GAC AGT GCA CC	-	Einführen einer Punktmutation, um interne BamH1-Schnittstelle zu inaktivieren. A zu C (rot) an Position 1092 des ORF. Aminosäuresequenz dadurch unverändert.
PSR_muta2	PSR (human)	Nuk. 1071-1117	GGT GCA CTG TCC CAT CGC CCT CGG AGC CAG ACT CGC ACT CTG AGT CG	-	Reverse-Primer zu PSR_muta1
PSR_Kpn1_for	PSR (human)	Nuk. 1-28	GGG GTA CCA TGA ACC ACA AGA GCA AGA AGC GCA TCC	Kpn1	Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1, pEGFP-C1 und pcDNA3.
PSR_BamH1_rev	PSR (human)	Nuk. 1187-1209	CGG GAT CCG GCC TGG AGG AGC TGC GCT CTT TGC	BamH1	Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Ohne STOP-Codon. Zur Klonierung in pEGFP-N1.
PSR-BamH1revSTOP	PSR (human)	Nuk. 1194-1212	CGG GAT CCT CAC CTG GAG GAG CTG CGC	BamH1	Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Mit STOP-Codon. Zur Klonierung in pEGFP-C1 und pcDNA3.
ASM1-1	PSR (human)	Nuk. 545-575	CCG GAA CTG GGA TTG CCA TCG ACC CTC TGG G	-	Einführen einer Punktmutation, um Histidin 187 in Alanin zu verändern. Nukleotide 559-561 des ORF von CAC zu GCC (rot) mutiert.
ASM1-2	PSR (human)	Nuk. 545-575	CCC AGA GGG TCG ATG GCA ATC CCA GTT CCG G	-	Reverse-Primer zu ASM1-1
ASM2-1	ASM1	Nuk. 553-585	GGG ATT GCC ATC GGC CCT CTG GGA ACC AGT GCC	-	Einführen einer Punktmutation, um Aspartat 189 in Alanin zu verändern. Nukleotide 565-567 des ORF von GAC zu GCC (rot) mutiert.
ASM2-2	ASM1	Nuk. 553-585	GGC ACT GGT TCC CAG AGG GGC GAT GGC AAT CCC	-	Reverse-Primer zu ASM2-1
BamH1-PSRspliceVar1	PSR (human)	Nuk. 914-942	CGG GAT CCC GCC TAT ACC ATT TCC TTG ATA ACT TTG GTC	BamH1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der am C-Terminus die Aminosäuren 315-403 fehlen. Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1.
BamH1-trunc	PSR (human)	Nuk. 993-1011	CGG GAT CCC GCC CTG TGG ACT CCT GAA GG	BamH1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der am C-Terminus die Aminosäuren 338-403 fehlen. Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1.
3BamH1-Δ363-403PSR	PSR (human)	Nuk. 1066-1086	CGG GAT CCC GCT CGC ACT CTG AGT CGG AGT C	BamH1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der am C-Terminus die Aminosäuren 363-403 fehlen. Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1.
3BamH1-Δ380-403PSR	PSR (human)	Nuk. 1121-1140	CGG GAT CCC GGC ACG TCC TCC TCT TCT TCC	BamH1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der am C-Terminus die Aminosäuren 380-403 fehlen. Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1.
PSRΔ1-4-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 13-33	GGG GTA CCA TGA GCA AGA AGC GCA TCC GCG AG	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten vier Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.

Name	Gen	bindet an	Sequenz	Schnittstelle	Info
PSRΔ1-7-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 22-40	GGG GTA CCA TGC GCA TCC GCG AGG CCA AGC	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten sieben Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-10-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 31-48	GGG GTA CCA TGG AGG CCA AGC GGA GTG CG	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten zehn Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-13-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 40-55	GGG GTA CCA TGC GGA GTG CGC GGC CGG	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten 13 Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-25-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 76-97	GGG GTA CCA TGT GGA CCC GGC ACA ACT ACT ACG	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten 25 Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-48-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 145-169	GGG GTA CCA TGG CAG ATG CTT TAC AGC TGT CTG TGG	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten 48 Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-87-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 262-289	GGG GTA CCA TGG AGC GCC TAA AAA GGA AAT ATC GGA ACC	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten 87 Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-131-ATG-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 394-422	GGG GTA CCA TGA TCT TTG ACA GCA GCT ATG GTG AAC ACC C	Kpn1	Verkürzte Jmjd6-Variante, der die ersten 131 Aminosäuren fehlen. Neues ATG eingeführt (rot). Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1 und pcDNA3.
PSRΔ1-13-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 40-55	GGG GTA CCC GGA GTG CGC GGC CGG	Kpn1	wie PSRΔ1-13-ATG-Kpn1, nur ohne neues ATG, da für Klonierung in pEGFP-C1.
PSRΔ1-25-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 76-97	GGG GTA CCT GGA CCC GGC ACA ACT ACT ACG	Kpn1	wie PSRΔ1-25-ATG-Kpn1, nur ohne neues ATG, da für Klonierung in pEGFP-C1.
PSRΔ1-48-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 145-169	GGG GTA CCG CAG ATG CTT TAC AGC TGT CTG TGG	Kpn1	wie PSRΔ1-48-ATG-Kpn1, nur ohne neues ATG, da für Klonierung in pEGFP-C1.
PSRΔ1-87-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 262-289	GGG GTA CCG AGC GCC TAA AAA GGA AAT ATC GGA ACC	Kpn1	wie PSRΔ1-87-ATG-Kpn1, nur ohne neues ATG, da für Klonierung in pEGFP-C1.
PSRΔ1-131-Kpn1	PSR (human)	Nuk. 394-422	GGG GTA CCA TCT TTG ACA GCA GCT ATG GTG AAC ACC C	Kpn1	wie PSRΔ1-131-ATG-Kpn1, nur ohne neues ATG, da für Klonierung in pEGFP-C1.
AsiS1-PSR	PSR (human)	Nuk. 4-29	GCG ATC GCA ACC ACA AGA GCA AGA AGC GCA TCC	AsiS1	Führt 5'-AsiS1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pF2H-bait.
Not1-PSR	PSR (human)	Nuk. 1195-1212	AAG GAA AAA AGC GGC CGC CCT GGA GGA GCT GCG	Not1	Führt 3'-Not1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pF2H-bait.
Kpn1-U2AF65-for	U2AF65 (human)	Nuk. 1-24	GGG GTA CCA TGT CGG ACT TCG ACG AGT TCG AG	Kpn1	Führt 5'-Kpn1-Schnittstelle ein. Zur Klonierung in pEGFP-N1, pEGFP-C1 und pcDNA3.
BamH1-U2AF65-rev	U2AF65 (human)	Nuk. 1408-1425	CGG GAT CCC GCC AGA AGT CCC GGC GGT G	BamH1	Führt 3'-BamH1-Schnittstelle ein. Ohne STOP-Codon. Zur Klonierung in pEGFP-N1.

5.10 PLASMIDE

Name	Hersteller
pEGFP-N1	Clontech
pEGFP-C1	Clontech
pEYFP-C1	Clontech
pcDNA3	Invitrogen
pF2H-bait	Labor Heinrich Leonhardt (LMU, München)
pECFP-N1-TAPc	Labor Heiko Hermeking (MPI für Biochemie, Martinsried)
pCMV-Sport6	Invitrogen
pmCherry-N1	Clontech
pTN24	Labor Nasim Talat (King's College, London)

5.11 KLONE

Insert	Plasmid	Schnittstellen (5'/3')	Information	Herkunft
Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1		diese Arbeit
Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1		diese Arbeit
Jmjd6 (human)	pcDNA3	Kpn1 / BamH1		diese Arbeit
Jmjd6 (human)	pECFP-TAPc	Kpn1 / BamH1	TAP-tag Experiment	diese Arbeit
Jmjd6 (human)	pF2H-bait	AsiS1 / Not1	F2H-Experiment	diese Arbeit
Jmjd6 (human)	pCMV-Sport6	Sal1 / Not1		RZPD, Berlin
Jmjd6-ATHM (human)	pcDNA3	Kpn1 / BamH1	G304A + R305A + P306A (AT-hook-Mutante)	Corinna Schmitz, Diplomarbeit, LMU München
Jmjd6-ATHM (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	G304A + R305A + P306A (AT-hook-Mutante)	diese Arbeit
Jmjd6-ATHM (human)	pmCherry-N1	Kpn1 / BamH1	G304A + R305A + P306A (AT-hook-Mutante)	diese Arbeit
Jmjd6-ASM1 (human)	pcDNA3	Kpn1 / BamH1	H187A (potentielle Fe(II)-Bindestelle HxD...H mutiert)	diese Arbeit
Jmjd6-ASM1 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	H187A (potentielle Fe(II)-Bindestelle HxD...H mutiert)	diese Arbeit
Jmjd6-ASM1 (human)	pmCherry-N1	Kpn1 / BamH1	H187A (potentielle Fe(II)-Bindestelle HxD...H mutiert)	diese Arbeit
Jmjd6-ASM2 (human)	pcDNA3	Kpn1 / BamH1	H187A + D189A (potentielle Fe(II)-Bindestelle HxD...H mutiert)	diese Arbeit
Jmjd6-ASM2 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	H187A + D189A (potentielle Fe(II)-Bindestelle HxD...H mutiert)	diese Arbeit
Δ222-403Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / -	Aminosäuren 222-403 fehlen. Entstanden durch eine Mutation zum STOP-Codon im ORF.	diese Arbeit
Δ315-403Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 315-403 fehlen.	diese Arbeit
Δ338-403Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 338-403 fehlen.	diese Arbeit
Δ363-403Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 363-403 fehlen.	diese Arbeit
Δ1-4Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-4 fehlen.	diese Arbeit
Δ1-4Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-4 fehlen.	diese Arbeit
Δ1-7Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-7 fehlen.	diese Arbeit

Insert	Plasmid	Schnittstellen (5'/3')	Information	Herkunft
Δ 1-7Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-7 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-10Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-10 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-10Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-10 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-13Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-13 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-13Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-13 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-25Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-25 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-25Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-25 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-48Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-48 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-48Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-48 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-87Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-87 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-87Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-87 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-131Jmjd6 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-131 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
Δ 1-131Jmjd6 (human)	pEGFP-C1	Kpn1 / BamH1	Aminosäuren 1-131 fehlen.	<i>diese Arbeit</i>
U2AF35 (human)	pEYFP-C1	BamH1 / EcoR1		Labor Angus Lamond (University of Dundee)
U2AF65 (human)	pEYFP-C1	BamH1 / EcoR1		Labor Angus Lamond (University of Dundee)
U2AF65 (human)	pEGFP-N1	Kpn1 / BamH1		<i>diese Arbeit</i>
DNMT1 (human)	pEGFP-N1			Labor Heinrich Leonhardt (LMU, München)
PCNA (Maus)	pERFP-N1			Labor Heinrich Leonhardt (LMU, München)

6. METHODEN

6.1 WESTERN BLOT

Nach dem Auftrennen der Proteinproben über ein Polyacrylamid-Gel wurden sie in 1x Blotpuffer bei 200 mA für 2 h auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Detektion mit ECL:

Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden mit 5% Milchpulver/TBST geblockt (1 h), bevor der Blot 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper inkubiert wurde. Der 1. Antikörper wurde in 5% Milchpulver/TBST verdünnt. Anschließend wurde dreimal für 10 min in TBST gewaschen und danach mit dem passenden 2. Antikörper (Peroxidase-gekoppelt, ebenfalls in 5% Milchpulver/TBST verdünnt) inkubiert. Es wurde anschließend wieder dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen, um danach die gebundenen Antikörper mit ECL nachzuweisen.

Detektion mit dem Odyssey (LI-COR):

Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden mit 5% Milchpulver/TBS geblockt (1 h), bevor der Blot 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper inkubiert wurde. Der 1. Antikörper wurde in 5% Milchpulver/TBST verdünnt. Anschließend wurde dreimal für 10 min in TBST gewaschen und danach mit dem passenden 2. Antikörper (IRDye700 bzw. IRDye800, ebenfalls in 5% Milchpulver/TBST verdünnt) im Dunkeln inkubiert. Alle folgenden Waschschrte wurden ebenfalls im Dunkeln absolviert. Es wurde anschließend wieder dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen, um danach die gebundenen Antikörper am Odyssey nachzuweisen.

6.2 COOMASSIE-FÄRBUNG

Für Coomassie-Färbungen von Proteingelen wurden die Färbelösungen des NuPage-Systems von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers benutzt. Gele wurden für 3 h in Färbelösung inkubiert und anschließend in Wasser über Nacht entfärbt.

6.3 ZELLKULTUR

Sämtliche Zelllinien (HEK 293T, HeLa, BHK, NIH 3T3) wurden in DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, Penizillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

6.4 IMMUNFLUORESZENZ

Zellen wurden im 6-well auf einem Deckglas (18 mm) bis zu einer Dichte von etwa 70-80% kultiviert. Fixiert wurden die Zellen für 10 min in 4% PFA (in PBS), anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um dann 2 min in 100% MeOH (-20°C) inkubiert zu werden. Nach dreimal Waschen mit PBS wurde mit 1% Triton (in PBS) für 10 min permeabilisiert (Alternative Fixierungsmethoden wurden getestet: 2% PFA; 3,7% FA; jeweils +/- MeOH).

Nach 1 h in Blocklösung (10% FCS, 0,2% Tween-20 in PBS) kam der erste Antikörper in Blocklösung verdünnt für 1 h (Raumtemperatur) auf die Zellen. Anschließend wurde dreimal mit Waschlösung (1% BSA, 0,2% Tween-20 in PBS) für jeweils 10 min gewaschen, bevor mit dem zweiten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der zweite Antikörper wurde in Blocklösung verdünnt und war entweder FITC- oder Cy3-markiert. Zur Kernfärbung wurde DAPI und To-Pro3 in einer Endkonzentration von 10 ng/ml in PBS (5 min Inkubation) verwendet. Abschließend wurden die Zellen noch kurz in PBS gewaschen und mit Vektashield auf den Objektträger gebracht. Für jeden Versuch wurden 1%-Triton-Lösung, Blocklösung und Waschlösung neu gemischt.

RNase A Behandlung:

Sollte RNA in den Zellen abgebaut werden, so wurden die Zellen vor der endgültigen Fixierung 2 min mit 100% MeOH behandelt, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und dann 2 h mit RNase A (100 µg/ml) in PBS bei 25 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit 4% PFA fixiert und dann wieder dem normalen Immunfluoreszenz-Protokoll (s.o.) gefolgt. Kontrollen wurden identisch behandelt, nur ohne RNase A.

6.5 TRANSFEKTION

Für die Transfektion wurden die Transfektionsreagenzien Lipofectamin2000, Nanofectin oder PEI (pH 7,0 oder pH 10,0) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. 3 h nach Transfektion wurde Medium gewechselt, 24 h nach Transfektion wurden die Zellen je nach Anwendung weiterbehandelt.

6.6 ZELLAUFSCHLUSS

Anfangs wurde mit drei verschiedenen Lysepuffern getestet, wie gut sich Jmjd6 unter den jeweiligen Bedingungen aus dem Pellet löst: NET-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 0,5% NP-40, C10, PB), NET500-Puffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 0,5% NP-40, C10, PB) und RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat, pH 7, 1% NP-40, 1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, C10, PB). Es hatte sich gezeigt, dass schon mit dem mildesten Puffer (NET) mehr als 50% des Proteins im löslichen Überstand zu finden sind. Für alle weiteren Versuche wurde dann NET-Puffer als Lysepuffer verwendet. Bei der gesamten Prozedur wurde immer auf Eis oder bei 4°C gearbeitet und alle Gefäße und Lösungen vorgekühlt.

Die Zellen wurden zuerst vorsichtig mit PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 1000 g für 5 min bei 4°C, wurde das Zellpellet dann in einem adäquaten Volumen Lysepuffer aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde bei 14000 g für 10 min (4°C) zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet.

RNase A Behandlung:

Um die RNA im Lysat abzubauen wurde dem Lysepuffer RNase A mit Endkonzentrationen von 50 µg/ml, 250 µg/ml oder 500 µg/ml zugesetzt.

6.7 mRNA ISOLIERUNG AUS HeLa-ZELLEN UND cDNA-SYNTHESE

Aus HeLa-Zellen (6-well, ca. $9,5 \times 10^5$ Zellen) wurde mithilfe des Quickprep mRNA Purification Kits (GE Healthcare) nach dem Protokoll im Handbuch die mRNA isoliert. Diese wurde anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht gefällt. Am darauffolgenden Tag wurde die gefällte mRNA für 5 min bei 16000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und dann in 20 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Zur cDNA Synthese wurde der First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) verwendet. Hierfür wurden 100 ng mRNA eingesetzt. Anschließend wurde nach dem Protokoll im Handbuch vorgegangen.

6.8 RNAi

Um Jmjd6 in Humanzellen (293T, HeLa) herunter zu regulieren wurden die stealth siRNAs 132, 275 und control-275 von Invitrogen benutzt. Stealth-132 korrespondiert zu den Nuk. 132-156, stealth-275 zu den Nuk. 275-299 des ORF von Jmjd6. Als Negativkontrolle fungierte stealth-control-275 die keine korrespondierende Sequenz im Jmjd6 hat. Die Transfektion der siRNAs wurde mit Lipofectamin2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die besten "knock-down" Ergebnisse wurden mit folgendem Prozedere erreicht:

Die Zellen (ca. 50-60 % konfluent im 12-well) wurden am Tag 1 mit 200 nM stealth-132, stealth-275 bzw. stealth-control-275 transfiziert. Als weitere Kontrolle diente eine mock-Transfektion ohne siRNA. Am Tag 2 (20h nach Transfektion) wurden die Zellen aus dem 12-well in ein 6-well passagiert und 4 h später mit je 200 nM passender siRNA retransfiziert. Den effektivsten "knock-down" konnte man dann am Tag 5 registrieren. Kontrolliert wurde der Effekt sowohl in der Immunfluoreszenz mit anti-Jmjd6 Antikörper, als auch im Western Blot.

"in-vivo-splicing-assay":

Hierfür wurden die Zellen am Tag 4 mit pTN24 transfiziert und anschließend wie unter 6.17 beschrieben behandelt.

siRNA	Sequenz
132	UAA CGU GGA AAG GGC AGA UGC UUU A
275	GGA AAU AUC GGA ACC AGA AGU UCA A
275-control	GGA UAU GGC CAA GAC GAA UUA ACA A

6.9 TANDEM-AFFINITY-PURIFICATION (TAP-TAG)

Transfektion:

Pro Ansatz wurden ca. 4×10^8 HEK 293T Zellen transient mit pECFP-N1-TAPc-Jmjd6 transfiziert (PEI 7.0). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert.

Lyse:

Die Zellen wurden mit PBS (kalt) gewaschen und abgekratzt. Im Eppendorfgefäß bei 1000g, 4°C, 5 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit Lysepuffer für 15 min auf Eis inkubiert. Nach zwei Zyklen Stickstoff und 25°C Wasserbad im Wechsel wurde 1 min, 13000g, 4°C zentrifugiert.

Lysepuffer	
150 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
0,5%	NP40
	C10
	Pefabloc
100 µl	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1
100 µl	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
100 nM	Okadaische Säure
5 mM	DTT
2 mM	N-Oxalylglycin (optional, nur in Ansatz 2 eingesetzt!)

Reinigungsschritt 1 - IgG Sepharose:

Die äquilibrierte Sepharose (IgG Sepharose 6 Fast Flow, Amersham) wurde mit dem Lysatüberstand bei 4°C über Nacht am Drehrad inkubiert. Anschließend auf eine Säule geladen und 2x mit 30 ml IPP150-Puffer gewaschen. Für die proteolytische Spaltung des TAP-tags mit TEV Protease (AcTEV Protease, Invitrogen) wurden 30U TEV Protease (15U/ml Lysat) eingesetzt, inkubiert in 3 ml IPP150-Puffer und 3 h bei 4°C rotiert.

IPP150 Puffer	
150 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
0,1%	NP40

Reinigungsschritt 2 - Calmodulin-Affinitätssäule:

Das TEV-Protease Eluat wurde mit 9 ml IPP150-CBB Puffer und 9 μ l CaCl_2 auf die Calmodulin-Affinitätssäule (Calmodulin Affinity Resin, Stratagene) gegeben und 3 h bei 4°C rotiert. Nach einem Waschschrift mit 30 ml IPP150-CBB Puffer konnten die gebundenen Proteine mit 3 ml IPP-CEB-Puffer von der Calmodulin-Affinitätssäule eluiert werden. Dazu wurde 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert.

IPP150-CBB Puffer	
150 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
0,1%	NP40
1 mM	Mg-Acetat
1 mM	Imidazol
2 mM	CaCl_2
10 mM	β -Mercaptoethanol

IPP150-CEB Puffer	
150 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
0,1%	NP40
1 mM	Mg-Acetat
1 mM	Imidazol
2 mM	EGTA
10 mM	β -Mercaptoethanol

Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA):

Um die Proteinkonzentration im finalen Eluat zu erhöhen wurden die Proteine mit TCA gefällt. Die TCA Endkonzentration soll 12% betragen. Nach einem Zentrifugationsschritt (16000g, 4°C, 40 min) wurde das Pellet 2x mit Aceton gewaschen und danach 15 min bei 16000g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet bei 56°C 2 min getrocknet und anschließend in 60 μ l Wasser aufgenommen. Diese Proben wurden dann für die massenspektrometrische Analyse verwendet.

6.10 “MULTIDIMENSIONAL PROTEIN IDENTIFICATION TECHNOLOGY” (MUDPIT)

Das halbe finale Eluat (ca. 120 µg Protein) eines Jmjd6-TAP-tag-Experiments aus 4×10^8 HEK 293T Zellen wurde für eine mudPIT Analyse eingesetzt. Die Analyse wurde im Labor von John Yates am Scripps Research Institute in La Jolla, CA, USA durchgeführt.

Vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgte der proteolytische Verdau mit Trypsin und die Auftrennung des Peptidgemisches über eine 2-Säulen-Chromatographie. Säule 1 ist ein starker Kationenaustauscher (SCX; Partisphere strong cation exchange resin; Whatman, Clifton, NJ, USA), von dem einzelne Fraktionen mit steigenden Salzkonzentrationen eluiert wurden und direkt auf Säule 2 (Aqua C₁₈ reversed phase 5 µm resin; Phenomenex, Torrance, CA, USA) geladen wurden. Mit steigendem Acetonitril-Gradient wurde von Säule 2 direkt in die Ionisierungsquelle eines LCQ-Tandem-massenspektrometers eluiert. Die Vorgehensweise folgt dem Protokoll aus Delahunty & Yates, Methods, 2005. Die Identifikation der Peptide/Proteine wurde mit der SEQUEST und DTASelect Software durchgeführt (Sadygov RG et al, 2004).

6.11 GFP “PULLDOWN”

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293T; ca. 9×10^5) wurden wie unter 6.5 beschrieben mit einem GFP- oder YFP-Konstrukt transient transfiziert. Als Kontrolle diente entweder der leere pEGFP-C1- oder pEYFP-C1-Vektor. 24 h nach Transfektion wurden Zelllysate mit 30 µl Lysepuffer (NET; siehe 6.6) hergestellt. Die Lysat-Überstände wurden anschließend mit Lysepuffer ohne NP-40 auf 60 µl verdünnt. 10% dieser Verdünnung wurden für die spätere Analyse abgenommen (Input). Der restliche Überstand wurde mit 20 µl GFP-nanotrap (Rothbauer U et al., 2008) inkubiert und 1 h bei 4°C gedreht. Nach der Zentrifugation bei 5000 g für 2 min (10% abnehmen = Durchfluss) wurde zweimal mit Waschpuffer (300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8) gewaschen und anschließend das Pellet (GFP nanotrap Sepharose beads) direkt mit 100 µl 2x SDS-Gel-Laufpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Abschließend wurde noch einmal zentrifugiert (5000 g, 2 min) und dann die interagierenden Proteine im Western Blot nachgewiesen.

6.12 “FLUORESCENT TWO-HYBRID (F2H) ASSAY”

(Zolghadr K et al., 2008)

Transgene baby hamster kidney (BHK) Zellen (Klon #2, Tsukamoto T et al., 2000) wurden wie unter 6.5 beschrieben mit einem GFP-Konstrukt und einem pF2H-bait-Konstrukt (Zolghadr K et al., 2008) transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden sie fixiert.

6.13 IMMUNPRÄZIPITATION MIT ANTI-U2AF65 ANTIKÖRPER (U4758)

Um an endogenem U2AF65 Hydroxy-Lysin nachweisen zu können, wurden ca. 3×10^8 HeLa-Zellen lysiert (NET-Puffer, siehe 6.6) und 10 min bei 14000g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde mit 30 μ l monoklonalem anti-U2AF65 Antikörper (U4758, Sigma) für eine Stunde bei 4°C inkubiert (Als Kontrollansatz fungierte eine identische Probe, die nicht mit Antikörper inkubiert wurde). Mit 60 μ l Protein G Sepharose 4 fast flow (Amersham Biosciences) konnte der Antikörper präzipitiert werden (1 h, 4°C). Nach drei Waschschritten (Waschpuffer: 300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8) wurden die Sepharose in Ladepuffer 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf ein 4-12% Gradientengel (NuPage, Invitrogen) aufgetragen und die Bande der richtigen Größe ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

6.14 IMMUNPRÄZIPITATION MIT ANTI-JMJD6 ANTIKÖRPER (AB10526)

Um an endogenem Jmjd6 Hydroxy-Lysin nachweisen zu können, wurden ca. 4×10^8 HeLa-Zellen lysiert (NET-Puffer, siehe 6.6) und 10 min bei 14000g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde mit 30 μ l polyklonalem anti-Jmjd6 Antikörper (ab10526, Abcam) für eine Stunde bei 4°C inkubiert (Als Kontrollansatz fungierte eine identische Probe, die nicht mit Antikörper inkubiert wurde). Mit 60 μ l Protein G Sepharose 4 fast flow (Amersham Biosciences) konnte der Antikörper präzipitiert werden (1 h, 4°C). Nach drei Waschschritten (Waschpuffer: 300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8) wurden die Sepharose in Ladepuffer 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf ein 4-12% Gradientengel (NuPage, Invitrogen) aufgetragen und die Bande der richtigen Größe (Monomerbande) ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

6.15 IN-GEL-VERDAU VON U2AF65

Entfärben:

Für die massenspektrometrische Analyse wurde U2AF65 nach der Immunpräzipitation mit anti-U2AF65 Antikörper (siehe 6.13) auf ein 4-12%-SDS-Gel geladen und das Gel anschließend mit colloidalem Coomassie G250 gefärbt. Banden mit der richtigen Größe wurden ausgeschnitten und anschließend 10 min in 2 ml 50% Ammoniumhydrogencarbonat (AHC) in Ethanol bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde 10 min in 2 ml 100% Ethanol bei 37 °C geschüttelt. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis das Gelstück komplett entfärbt war.

Reduktion und Alkylierung:

Entfärbte Gelstücke inkubierten anschließend für 45 min bei 56 °C in AHC (25 mM) und DTT (10 mM) um Disulfidbrücken zu reduzieren, bevor sie dann 30 min in AHC (25 mM) und Iodacetamid (55 mM) im Dunkeln schüttelten. Die Gelstücke wurden anschließend zweimal je 10 min gewaschen (2 ml 50% AHC in Ethanol, 37 °C) und dehydriert (2 ml 100% Ethanol, 37 °C) im Wechsel. Nach dem letzten Schritt sollte das Ethanol komplett verdampfen. Für alle weiteren Schritte wurden Volumina eingesetzt, die immer in Abhängigkeit von der Größe der Gelstücke ausreichend waren, um die Gelstücke komplett zu bedecken.

Verdau:

Für den In-Gel-Verdau wurde die Peptidase Lys-C mit einer Konzentration von 12,5 ng/μl verwendet. Nach 10 min Inkubation auf Raumtemperatur wurde das doppelte Lys-C Volumen an AHC (25 mM) zugegeben. Der Verdau inkubierte anschließend über Nacht bei 37 °C.

Peptidelution aus Gel:

Zum Verdau wurde soviel Trifluor-Essigsäure (TFA) zugegeben, dass diese eine Endkonzentration von 3% hatte. Dieser Überstand und auch alle folgenden Überstände wurden in einem Eppendorf-Gefäß vereint und gesammelt. Zu den Gelstücken wurde anschließend 30% Acetonitril (ACN) / 3% TFA zugegeben und diese danach für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde gesammelt und die Gelstücke anschließend in 80% ACN aufgenommen und wieder für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Auch dieser Überstand wurde gesammelt und die Gelstücke danach in 100% ACN bei Raumtemperatur für 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde wieder gesammelt. Das Volumen der gesammelten Überstände wurde mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge auf etwa 50

- 100 µl reduziert. Diese Proben wurden nun entweder eingefroren oder direkt für die massenspektrometrische Analyse verwendet.

6.16 LC-MS/MS

Zur besseren Aufreinigung und Fraktionierung vor der LC-MS-Analyse wurden die Peptid-Proben auf Säulen, sog. "StageTips" geladen. Als Säulenmaterial wurden hierbei C₁₈-Silica und ein starker Kationenaustauscher (SCX) verwendet. Von den Säulen eluiert wurden die Proben in 96-well-Platten und anschließend in einer Vakuumzentrifuge erneut konzentriert. Die Vorgehensweise folgt dem Protokoll aus Rappsilber J. et al, Nature Protocols, 2007.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in der Gruppe von Matthias Mann (MPI für Biochemie, Martinsried) an einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer. Dabei wurde zur Elution ein Gradient (90 Minuten) von 2% - 45% Puffer B (80% ACN in Wasser) verwendet. Die Identifikation der Peptide/Proteine wurde mit der MaxQuant Software durchgeführt (Cox J & Mann M, 2008). Es wurden letztendlich nur Proteine betrachtet, die wenigstens durch zwei Peptide repräsentiert wurden, bei denen die Wahrscheinlichkeit für einen falsch-positiven Treffer weniger als 5% war und die Massengenauigkeit bei weniger als 3 ppm lag.

6.17 "DOUBLE-REPORTER-SPLICING-ASSAY"

(Nasim MT et al, 2002; Nasim & Eperon, 2006)

Das Plasmid pTN24 trägt β-Galactosidase und Luciferase (β-Gal, Luc) unter Kontrolle eines SV40-Promotors. Die beiden Reportergene sind durch ein Intron getrennt, das drei STOP-Codons im richtigen Leserahmen trägt. HeLa-Zellen wurden mit pTN24 transient transfiziert. Kotransfiziert wurden verschiedene Konstrukte im pcDNA3-Plasmid: Wildtyp Jmjd6, ASM2-Jmjd6-Mutante, HyIns1 (ProInsulin 1, Hydra vulgaris). Als weitere Kontrolle diente der leere pcDNA3-Vektor.

Enzymaktivität:

24 h nach Transfektion wurden die Zellen 15 min mit "Passive Lysisbuffer" (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega) inkubiert und anschließend 1 min bei 14000 g zentrifugiert. Jeweils 10 µl

des löslichen Überstands wurden für eine Messung der Enzymaktivität eingesetzt. Gemessen wurde in beiden Fällen in einem Luminometer (Lumat 9501, Berthold).

Für die Detektion der Luciferase-Aktivität wurden je 100 µl Luciferase Assay Puffer II (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Jeder Ansatz wurde dreimal unabhängig gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet.

Für die Detektion der β -Galactosidase-Aktivität wurde Galacto-Light Reagenz (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Zugabe der 10 µl Lysat inkubierte der Ansatz genau (!) 30 min bei Raumtemperatur, bevor er gemessen wurde. Jeder Ansatz wurde dreimal unabhängig gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet.

Semiquantitative PCR:

24 h nach Transfektion wurde die Gesamt-mRNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 6.7). Die cDNA wurde dann für die PCR mit zwei Primern (GalFor, LucRev) eingesetzt, die das Intron zwischen β -Gal und Luc einschließen.

Primer	Sequenz
GalFor	AAC ATC AGC CGC TAC AGT CAA
LucRev	ACG TGA TGT TCT CCT CGA TAT

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vagbo CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjoras M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. **Nature** 2003 Feb 20;421(6925):859-63.

Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. **Nature** 2007 Oct 11;449(7163):731-4.

Albiez H, Cremer M, Tiberi C, Vecchio L, Schermelleh L, Dittrich S, Küpper K, Joffe B, Thormeyer T, von Hase J, Yang S, Rohr K, Leonhardt H, Solovei I, Cremer C, Fakan S, Cremer T. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. **Chromosome Res.** 2006;14(7):707-33.

Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. **Nucleic Acids Res.** 1998 Oct 1;26(19):4413-21.

Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell** 2003 Apr;4(4):587-98.

Bannister AJ, Kouzarides T. Histone methylation: recognizing the methyl mark. **Methods Enzymol.** 2004;376:269-88.

Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. **J Mol Biol.** 1998 Jul 10;280(2):275-86.

Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. **Mol Cell.** 2005 Apr 29;18(3):263-72.

Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates JR 3rd, Hermeking H. Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. **Mol Cell Proteomics** 2005 Jun;4(6):785-95.

Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. **Cell** 2002 Feb 8;108(3):345-56.

Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ 3rd, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. **Cell** 2005 Jan 28;120(2):169-81.

Böse J, Gruber AD, Helming L, Schiebe S, Wegener I, Hafner M, Beales M, Köntgen F, Lengeling A. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. **J Biol.** 2004;3(4):15.

Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2007 Jul;8(7):574-85.

Bossis G, Malnou CE, Farras R, Andermarcher E, Hipkind R, Rodriguez M, Schmidt D, Muller S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. **Mol Cell Biol.** 2005 Aug;25(16):6964-79.

Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther.** 2009 Feb;23(1):49-59.

Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 is a histone arginine demethylase. **Science** 2007 Oct 19;318(5849):444-7.

- Chen YH, Comeaux LM, Eyles SJ, Knapp MJ.** Auto-hydroxylation of FIH-1: an Fe(ii), alpha-ketoglutarate-dependent human hypoxia sensor. **Chem Commun.** 2008 Oct 21;(39):4768-70.
- Cheng D, Côté J, Shaaban S, Bedford MT.** The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. **Mol Cell.** 2007 Jan 12;25(1):71-83.
- Cikala M, Alexandrova O, David CN, Pröschel M, Stiening B, Cramer P, Böttger A.** The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. **BMC Cell Biol.** 2004 Jun 11;5:26.
- Cléry A, Blatter M, Allain FH.** RNA recognition motifs: boring? Not quite. **Curr Opin Struct Biol.** 2008 Jun;18(3):290-8.
- Clifton IJ, McDonough MA, Ehrismann D, Kershaw NJ, Granatino N, Schofield CJ.** Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. **J Inorg Biochem.** 2006 Apr;100(4):644-69.
- Clissold PM, Ponting CP.** JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. **Trends Biochem Sci.** 2001 Jan;26(1):7-9.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH, Helin K.** The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. **Nature** 2006 Jul 20;442(7100):307-11.
- Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS.** Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annu Rev Immunol.** 1992;10:267-93.
- Coleman ML, McDonough MA, Hewitson KS, Coles C, Mecinovic J, Edelmann M, Cook KM, Cockman ME, Lancaster DE, Kessler BM, Oldham NJ, Ratcliffe PJ, Schofield CJ.** Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor. **J Biol Chem.** 2007 Aug 17;282(33):24027-38.
- Coleman ML, Ratcliffe PJ.** Oxygen sensing and hypoxia-induced responses. **Essays Biochem.** 2007;43:1-15.
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI.** The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. **EMBO J.** 1996 Jan 15;15(2):265-75.
- Costas M, Mehn MP, Jensen MP, Que L Jr.** Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. **Chem Rev.** 2004 Feb;104(2):939-86.
- Cox J, Mann M.** MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol.** 2008 Dec;26(12):1367-72.
- Cui P, Qin B, Liu N, Pan G, Pei D.** Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. **Exp Cell Res.** 2004 Feb 1;293(1):154-63.
- Delahunty C, Yates JR 3rd.** Protein identification using 2D-LC-MS/MS. **Methods** 2005 Mar;35(3):248-55.
- Eilbracht J, Reichenzeller M, Hergt M, Schnölzer M, Heid H, Stöhr M, Franke WW, Schmidt-Zachmann MS.** NO66, a highly conserved dual location protein in the nucleolus and in a special type of synchronously replicating chromatin. **Mol Biol Cell.** 2004 Apr;15(4):1816-32.
- Elkins JM, Hewitson KS, McNeill LA, Seibel JF, Schlemminger I, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ.** Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. **J Biol Chem.** 2003 Jan 17;278(3):1802-6.

- Emmott E, Hiscox JA.** Nucleolar targeting: the hub of the matter. **EMBO Rep.** 2009 Mar;10(3):231-8.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM.** A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature** 2000 May 4;405(6782):85-90.
- Fakan S, van Driel R.** The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. **Semin Cell Dev Biol.** 2007 Oct;18(5):676-81.
- Falnes PO, Johansen RF, Seeberg E.** AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. **Nature** 2002 Sep 12;419(6903):178-82.
- Falnes PO, Klungland A, Alseth I.** Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. **Neuroscience** 2007 Apr 14;145(4):1222-32.
- Faust M, Montenarh M.** Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? **Cell Tissue Res.** 2000 Sep;301(3):329-40.
- Fodor BD, Kubicek S, Yonezawa M, O'Sullivan RJ, Sengupta R, Perez-Burgos L, Opravil S, Mechler K, Schotta G, Jenuwein T.** Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. **Genes Dev.** 2006 Jun 15;20(12):1557-62.
- Fortes P, Bilbao-Cortés D, Fornerod M, Rigaut G, Raymond W, Séraphin B, Mattaj JW.** Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5' splice site recognition. **Genes Dev.** 1999 Sep 15;13(18):2425-38.
- Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ.** Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002 Apr 16;99(8):5367-72.
- Fu XD, Maniatis T.** Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. **Nature** 1990 Feb 1;343(6257):437-41.
- Gama-Carvalho M, Krauss RD, Chiang L, Valcárcel J, Green MR, Carmo-Fonseca M.** Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. **J Cell Biol.** 1997 Jun 2;137(5):975-87.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F.** Concepts in sumoylation: a decade on. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2007 Dec;8(12):947-56.
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP, Bickmore WA.** Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. **Cell.** 2004 Sep 3;118(5):555-66.
- Gui JF, Lane WS, Fu XD.** A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. **Nature.** 1994 Jun 23;369(6482):678-82.
- Hahn P, Böse J, Edler S, Lengeling A.** Genomic structure and expression of Jmjd6 and evolutionary analysis in the context of related JmjC domain containing proteins. **BMC Genomics** 2008 Jun 18;9:293.
- Hall LL, Smith KP, Byron M, Lawrence JB.** Molecular anatomy of a speckle. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.** 2006 Jul;288(7):664-75.
- Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ.** Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. **J Biol Chem.** 2002 Jul 19;277(29):26351-5.
- Hong JR, Lin GH, Lin CJ, Wang WP, Lee CC, Lin TL, Wu JL.** Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish. **Development** 2004 Nov;131(21):5417-27.

Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, Clore GM. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. **Nat Struct Biol.** 1997 Aug;4(8):657-65.

Hutton JJ Jr, Kaplan A, Udenfriend S. Conversion of the amino acid sequence gly-pro-pro in protein to gly-pro-hyp by collagen proline hydroxylase. **Arch Biochem Biophys.** 1967 Aug;121(2):384-91.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. **Science** 2001 Apr 20;292(5516):464-8.

Iwase S, Lan F, Bayliss P, de la Torre-Ubieta L, Huarte M, Qi HH, Whetstine JR, Bonni A, Roberts TM, Shi Y. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. **Cell** 2007 Mar 23;128(6):1077-88.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. **Science** 2001 Apr 20;292(5516):468-72.

Jiang M, Ma Y, Cheng H, Ni X, Guo L, Xie Y, Mao Y. Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HSPBAP1) from human fetal brain. **Cytogenet Cell Genet.** 2001;95(1-2):48-51.

Jurica MS. Detailed close-ups and the big picture of spliceosomes. **Curr Opin Struct Biol.** 2008 Jun;18(3):315-20.

Kalliri E, Grzyska PK, Hausinger RP. Kinetic and spectroscopic investigation of CoII, NiII, and N-oxalylglycine inhibition of the FeII/alpha-ketoglutarate dioxygenase, TauD. **Biochem Biophys Res Commun.** 2005 Dec 9;338(1):191-7.

Kielkopf CL, Rodionova NA, Green MR, Burley SK. A novel peptide recognition mode revealed by the X-ray structure of a core U2AF35/U2AF65 heterodimer. **Cell.** 2001 Sep 7;106(5):595-605.

Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. **Science** 2001 Sep 7;293(5536):1832-6.

Kivirikko KI, Pihlajaniemi T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.** 1998;72:325-98. Review.

Kjeldsen F, Savitski MM, Nielsen ML, Shi L, Zubarev RA. On studying protein phosphorylation patterns using bottom-up LC-MS/MS: the case of human alpha-casein. **Analyst.** 2007 Aug;132(8):768-76.

Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. **Nat Rev Genet.** 2006a Sep;7(9):715-27.

Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. **Nature** 2006b Jul 20;442(7100):312-6.

Klose RJ, Yan Q, Tothova Z, Yamane K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gilliland DG, Zhang Y, Kaelin WG Jr. The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. **Cell** 2007 Mar 9;128(5):889-900.

Koch HB, Zhang R, Verdoodt B, Bailey A, Zhang CD, Yates JR 3rd, Menssen A, Hermeking H. Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. **Cell Cycle** 2007 Jan 15;6(2):205-17.

- Krieser RJ, Moore FE, Dresnek D, Pellock BJ, Patel R, Huang A, Brachmann C, White K.** The *Drosophila* homolog of the putative phosphatidylserine receptor functions to inhibit apoptosis. **Development** 2007 Jul;134(13):2407-14.
- Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y.** Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. **Blood** 2004 May 1;103(9):3362-4.
- Kuroyanagi N, Onogi H, Wakabayashi T, Hagiwara M.** Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. **Biochem Biophys Res Commun.** 1998 Jan 14;242(2):357-64.
- Lamond AI, Spector DL.** Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2003 Aug;4(8):605-12.
- Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ.** Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. **Biochem J.** 2004 Nov 1;383(Pt. 3):429-37.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK.** FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. **Genes Dev.** 2002 Jun 15;16(12):1466-71.
- Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM, Ryu SE.** Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. **J Biol Chem.** 2003, 278:7558-7563.
- Lee MG, Norman J, Shilatifard A, Shiekhatter R.** Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. **Cell** 2007 Mar 9;128(5):877-87.
- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ.** The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO J.** 2000 Dec 15;19(24):6860-9.
- Lerch-Gaggl A, Haque J, Li J, Ning G, Traktman P, Duncan SA.** Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. **J Biol Chem.** 2002 Nov 22;277(47):45347-55.
- Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W.** Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. **J Biol Chem.** 2002 Dec 27;277(52):50607-11.
- Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P, Flavell RA.** Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. **Science** 2003 Nov 28;302(5650):1560-3.
- Lin JY, Ohshima T, Shimotohno K.** Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. **FEBS Lett.** 2004 Aug 27;573(1-3):15-8.
- Liu A, Ho RY, Que L Jr, Ryle MJ, Phinney BS, Hausinger RP.** Alternative reactivity of an alpha-ketoglutarate-dependent iron(II) oxygenase: enzyme self-hydroxylation. **J Am Chem Soc.** 2001 May 30;123(21):5126-7.
- Loenarz C, Schofield CJ.** Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. **Nat Chem Biol.** 2008 Mar;4(3):152-6.
- Long JC, Caceres JF.** The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. **Biochem J.** 2009 Jan 1;417(1):15-27.
- Mann M.** Functional and quantitative proteomics using SILAC. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2006 Dec;7(12):952-8.

- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR.** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med.** 1995 Nov 1;182(5):1545-56.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J.** Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. **EMBO J.** 2001, 20, 5197–5206
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW.** Understanding alternative splicing: towards a cellular code. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2005 May;6(5):386-98.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ.** The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature** 1999 May 20;399(6733):271-5.
- Mayeda A, Badolato J, Kobayashi R, Zhang MQ, Gardiner EM, Krainer AR.** Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. **EMBO J.** 1999 Aug 16;18(16):4560-70.
- Melchior F.** SUMO - nonclassical ubiquitin. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 2000;16:591-626.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R.** LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. **Nature** 2005 Sep 15;437(7057):436-9.
- Misteli T.** Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. **J Cell Sci.** 2000 Jun;113 (Pt 11):1841-9.
- Mitchell JE, Cvetanovic M, Tibrewal N, Patel V, Colamonici OR, Li MO, Flavell RA, Levine JS, Birge RB, Ucker DS.** The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells. **J Biol Chem.** 2006 Mar 3;281(9):5718-25.
- Mollet I, Barbosa-Morais NL, Andrade J, Carmo-Fonseca M.** Diversity of human U2AF splicing factors. **FEBS J.** 2006 Nov;273(21):4807-16.
- Moore MJ, Proudfoot NJ.** Pre mRNA Processing reaches back to transcription and ahead to translation. **Cell.** 2009 Feb 20;136(4):688-700.
- Murray K.** THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. **Biochemistry** 1964 Jan;3:10-5.
- Myllylä R, Wang C, Heikkinen J, Juffer A, Lampela O, Risteli M, Ruotsalainen H, Salo A, Sipilä L.** Expanding the lysyl hydroxylase toolbox: new insights into the localization and activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3). **J Cell Physiol.** 2007 Aug;212(2):323-9.
- Nasim MT, Chowdhury HM, Eperon IC.** A double reporter assay for detecting changes in the ratio of spliced and unspliced mRNA in mammalian cells. **Nucleic Acids Res.** 2002 Oct 15;30(20):e109.
- Nasim MT, Eperon IC.** A double-reporter splicing assay for determining splicing efficiency in mammalian cells. **Nat Protoc.** 2006;1(2):1022-8.
- Ozer A, Bruick RK.** Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? **Nat Chem Biol.** 2007 Mar;3(3):144-53.
- Paik WK, Kim S.** Enzymatic methylation of histones. **Arch Biochem Biophys.** 1969 Nov;134(2):632-7.
- Pahlisch S, Zakaryan RP, Gehring H.** Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. **Biochim Biophys Acta.** 2006 Dec;1764(12):1890-903.

- Petty JT, Bordelon JA, Robertson ME.** Thermodynamic characterization of the association of cyanine dyes with DNA. *J Phys Chem B* 2000; 104:7221-7227.
- Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S.** SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 2005 Jul 21;436(7049):428-33.
- Prasanth KV, Sacco-Bubulya PA, Prasanth SG, Spector DL.** Sequential entry of components of the gene expression machinery into daughter nuclei. *Mol Biol Cell.* Mar;14(3):1043-57.
- Puig O, Bragado-Nilsson E, Koski T, Séraphin B.** The U1 snRNP-associated factor Luc7p affects 5' splice site selection in yeast and human. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(17):5874-85.
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B.** The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 2001 Jul;24(3):218-29.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y.** Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1896-906.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M.** Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 2002 Aug;12(8):1231-45.
- Reeves R, Nissen MS.** The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem.* 1990 May 25;265(15):8573-82.
- Reichow SL, Hamma T, Ferré-D'Amaré AR, Varani G.** The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(5):1452-64.
- Richardson JP, Wang M, Clarke JH, Patel KJ, Irvine RF.** Genomic tagging of endogenous type IIbeta phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase in DT40 cells reveals a nuclear localisation. *Cell Signal.* 2007 Jun;19(6):1309-14.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B.** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 1999 Oct;17(10):1030-2.
- Rino J, Desterro JM, Pacheco TR, Gadella TW Jr, Carmo-Fonseca M.** Splicing factors SF1 and U2AF associate in extrasplliceosomal complexes. *Mol Cell Biol.* 2008 May;28(9):3045-57.
- Rohila JS, Chen M, Chen S, Chen J, Cerny R, Dardick C, Canlas P, Xu X, Gribskov M, Kanrar S, Zhu JK, Ronald P, Fromm ME.** Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *Plant J.* 2006 Apr;46(1):1-13.
- Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H.** A versatile nano-trap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Feb;7(2):282-9.
- Ryle MJ, Liu A, Muthukumaran RB, Ho RY, Koehntop KD, McCracken J, Que L Jr, Hausinger RP.** O₂- and alpha-ketoglutarate-dependent tyrosyl radical formation in TauD, an alpha-keto acid-dependent non-heme iron dioxygenase. *Biochemistry.* 2003 Feb 25;42(7):1854-62.
- Saitoh N, Spahr CS, Patterson SD, Bubulya P, Neuwald AF, Spector DL.** Proteomic analysis of inter-chromatin granule clusters. *Mol Biol Cell* 2004 Aug;15(8):3876-90.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T.** Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 2002 Sep 26;419(6905):407-11.

Sadygov RG, Cociorva D, Yates JR 3rd. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. **Nat Methods** 2004 Dec;1(3):195-202.

Schneider JE, Böse J, Bamforth SD, Gruber AD, Broadbent C, Clarke K, Neubauer S, Lengeling A, Bhattacharya S. Identification of cardiac malformations in mice lacking Ptdsr using a novel high-throughput magnetic resonance imaging technique. **BMC Dev Biol.** 2004 Dec 22;4:16.

Schofield CJ, McDonough MA. Structural and mechanistic studies on the peroxisomal oxygenase phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (PhyH). **Biochem Soc Trans.** 2007 Nov;35(Pt 5):870-5.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2004 May;5(5):343-54.

Selenko P, Gregorovic G, Sprangers R, Stier G, Rhani Z, Krämer A, Sattler M. Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP. **Mol Cell.** 2003 Apr;11(4):965-76.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. **Mol Cell Biol.** 1992 Dec;12(12):5447-54.

Seward DJ, Cubberley G, Kim S, Schonewald M, Zhang L, Tripet B, Bentley DL. Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1 JmjC proteins. **Nat Struct Mol Biol.** 2007 Mar;14(3):240-2.

Sheng Z, Lewis JA, Chirico WJ. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. **J Biol Chem.** 2004 Sep 17;279(38):40153-60.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell** 2004 Dec 29;119(7):941-53.

Shin S, Janknecht R. Diversity within the JMJD2 histone demethylase family. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007 Feb 23;353(4):973-7.

Sickmier EA, Frato KE, Shen H, Paranawithana SR, Green MR, Kielkopf CL. Structural basis for polypyrimidine tract recognition by the essential pre-mRNA splicing factor U2AF65. **Mol Cell.** 2006 Jul 7;23(1):49-59.

Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. **Histochem Cell Biol.** 2008 Jan;129(1):13-31.

Spector DL, Fu XD, Maniatis T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. **EMBO J.** 1991 Nov;10(11):3467-81.

Stark LA, Taliansky M. Old and new faces of the nucleolus. Workshop on the Nucleolus and Disease. **EMBO Rep.** 2009 Jan;10(1):35-40.

Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, Higashinakagawa T. Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. **Genes Dev.** 1995 May 15;9(10):1211-22.

Tibrewal N, Liu T, Li H, Birge RB. Characterization of the biochemical and biophysical properties of the phosphatidylserine receptor (PS-R) gene product. **Mol Cell Biochem.** 2007 Oct;304(1-2):119-25.

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. **Nature** 2006 Feb 16;439(7078):811-6.

- Tsukamoto T, Hashiguchi N, Janicki SM, Tumber T, Belmont AS, Spector DL.** Visualization of gene activity in living cells. **Nat Cell Biol.** 2000 Dec;2(12):871-8.
- Valcárcel J, Gaur RK, Singh R, Green MR.** Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA. **SCIENCE.** 1996 Sep 20;273(5282):1706-9.
- Vaz FM, Wanders RJ.** Carnitine biosynthesis in mammals. **Biochem J.** 2002 Feb 1;361(Pt 3):417-29.
- Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P.** Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **J Exp Med.** 1995 Nov 1;182(5):1597-601.
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr.** Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angew Chem Int Ed Engl.** 2005 Dec 1;44(45):7342-72.
- Wang GS, Cooper TA.** Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. **Nat Rev Genet.** 2007 Oct;8(10):749-61.
- Wang X, Wu YC, Fadok VA, Lee MC, Gengyo-Ando K, Cheng LC, Ledwich D, Hsu PK, Chen JY, Chou BK, Henson P, Mitani S, Xue D.** Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. **Science** 2003 Nov 28;302(5650):1563-6.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd.** Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol.** 2001 Mar;19(3):242-7.
- Webby CJ, Wolf A, Gromak N, Dreger M, Kramer H, Kessler B, Nielsen ML, Schmitz C, Butler DS, Yates JR, Delahunty CM, Hahn P, Lengeling A, Mann M, Proudfoot NJ, Schofield CJ, Böttger A.** Jmjd6 catalyses Lysyl-hydroxylation of U2AF65 - a protein associated with RNA splicing. **Science** (manuscript submitted).
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol.** 1980;68:251-306.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y.** JHDM2A, a JmJC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. **Cell** 2006 May 5;125(3):483-95.
- Yu, F., White, S. B., Zhao, Q. & Lee, F. S.** HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 2001, 98, 9630–9635.
- Zamore PD, Patton JG, Green MR.** Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. **Nature** 1992 Feb 13;355(6361):609-14.
- Zhang G, Taneja KL, Singer RH, Green MR.** Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. **Nature.** 1994 Dec 22-29;372(6508):809-12.
- Zolghadr K, Mortusewicz O, Rothbauer U, Kleinhans R, Goehler H, Wanker EE, Cardoso MC, Leonhardt H.** A fluorescent two-hybrid (F2H) assay for direct visualization of protein interactions in living cells. **Mol Cell Proteomics.** 2008 Nov;7(11):2279-87.

Publikationen

1. Webby CJ¹, **Wolf A**¹, Gromak N¹, Dreger M, Kramer H, Kessler B, Nielsen ML, Schmitz C, Butler DS, Yates JR, Delahunty CM, Hahn P, Lengeling A, Mann M, Proudfoot NJ, Schofield CJ, Böttger A. Jmjd6 catalyses Lysyl-hydroxylation of U2AF65 - a protein associated with RNA splicing. **Science** 2009 Jul 3;325(5936):90-3. (¹ these authors contributed equally to this work)
2. **Wolf A**, Schmitz C, Böttger A. Changing story of the receptor for phosphatidylserine-dependent clearance of apoptotic cells. **EMBO Rep.** 2007 May;8(5):465-9
3. Alexopoulos H, Böttger A, Fischer S, Levin A, **Wolf A**, Fujisawa T, Hayakawa S, Gojobori T, Davies JA, David CN, Bacon JP. Evolution of gap junctions: the missing link? **Curr Biol.** 2004 Oct 26;14(20):R879-80

Manuskripte

1. Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, Balasubramanian PG, Borman J, Busam D, Disbennett K, Sumin N, Sutton GG, Viswanathan LD, Walenz B, Goodstein DM, Hellsten U, Kawashima T, Prochnik SE, Putnam NH, Shu S, Blumberg B, Dana CE, Gee L, Kibler DF, Law L, Lindgens D, Martinez DE, Peng J, Wigge PA, Bertulat B, Guder C, Nakamura Y, Ozbek S, Watanabe H, Khalturin K, Hemmrich G, Franke A, Augustin R, Fraune S, Hayakawa E, Hayakawa S, Hirose M, Hwang JS, Ikeo K, Nishimiya-Fujisawa C, Ogura A, Takahashi T, Steinmetz PRH, Zhang X, Aufschnaiter R, Eder MK, Gorny AK, Salvenmoser W, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Böttger A, Tischler P, **Wolf A**, Gojobori T, Remington TA, Strausberg RL, Venter JC, Technau U, Hobmayer B, Bosch TCG, Holstein TW, Fujisawa T, Bode HR, David CN, Rokhsar DS, Steele RE. The Dynamic Genome of Hydra. (submitted manuscript)
2. Webby CJ, **Wolf A**, Dreger M, Mantri M, Hamed R, Nielsen ML, Mann M, Böttger A, Schofield CJ. Self hydroxylation of Jmjd6, a 2OG and Fe(II) dependent lysyl 5-hydroxylase. (in preparation)

Patente

1. UK Patent Application No. 0809262.9 / Project MG/3702 (submitted)

Lebenslauf

Name: Alexander Wolf
Geburtsdatum: 18.08.1976
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (*2005, *2007)

1995 Abitur, Finsterwalder Gymnasium, Rosenheim

1995-1996 Zivildienst, Caritas Seniorenbegegnungsstätte, Rosenheim

1996-2001 Studium Biologie, LMU München
Hauptfach: Zellbiologie; Nebenfächer: Biochemie, Genetik, Informatik

2001-2003 Creative Director, INNdependent Media GmbH, Rosenheim

2003-2004 Diplomarbeit, Prof. Charles N David, LMU München
Titel: Innexine und Gap Junctions in Hydra

2005-2009 Promotion, PD Dr. Angelika Böttger, LMU München
Titel: Jmjd6 katalysiert Lysin-5-Hydroxylierungen an U2AF-65 und ist ein potentieller Regulator des Spleißprozesses

Danksagung

Ich danke Angelika und Charlie für die wunderbar menschliche Atmosphäre in der oftmals so verkrampten Wissenschaftswelt. Ich hatte saumäßig viel Spaß an meiner Arbeit in Eurem Labor. Danke dafür! Ein ebenso herzlicher Dank gilt Birgit Wetterauer und Alexandra Kolbinger, denen es mit viel Enthusiasmus und Geduld gelungen ist, mein Interesse für das wissenschaftliche Arbeiten zu wecken. Ihr seid Schuld daran, dass ich jetzt hier stehe. Dafür danke ich Euch sehr!

Steffie, Luisa und Jonas ist es gelungen, mir immer wieder im richtigen Moment die Augen für die wirklich wichtigen Dinge im Leben zu öffnen. Dafür liebe ich Euch!

Ich bin unwahrscheinlich froh, auch ein Leben ausserhalb des Labors zu haben. Ein sehr geiles noch dazu! Das dem so ist, verdanke ich Papa, Mama, Franziska, Ingrid, Gerhard, Mardl + Sandi, Ingo, Jockel, Andi, Christian + Sandra, Josl + Katharina, Barbara, Tina, Corinna, Frank, Roland, Hopper, Axel, Beppo, Maria + Martin und Eike.